

**BIOSYNTHESEINTERMEDIATE ALS
AUSGANGSVERBINDUNGEN BIOMIMETISCH
ORIENTIERTER ALKALOIDSYNTHESEN**

HELMUT SCHÜBEL



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0037

**BIOSYNTHESEINTERMEDIATE ALS
AUSGANGSVERBINDUNGEN BIOMIMETISCH
ORIENTIERTER ALKALOIDSYNTHESEN**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

Vorgelegt
von
HELMUT SCHÜBEL
aus Fürth / Bay.

Januar 1986

1. Referent : Doz. Dr. J.Stöckigt

2. Referent : Prof. Dr. M.H.Zenk

Eingereicht am 28.1.1986

Tag der mündlichen Prüfung : 25.2.1986

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. E I N L E I T U N G	1
II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	9
1. Pflanzliches Material	9
1.1. Differenzierte Pflanzen	9
1.2. Pflanzliche Zellkulturen	9
1.3. Quantitatives Animpfen bei Medienopti- mierung	10
1.4. Frisch- und Trockengewichtsbestimmung	10
2. Chemikalien	10
3. Geräte	10
4. Chromatographische Verfahren	11
4.1. Dünnschichtchromatographie	11
4.2. Säulenchromatographie	12
4.3. Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	12
4.4. Flüssig-Flüssig Verteilungschromatogra- phie	13
5. Spektroskopische Methoden	15
5.1. Massenspektroskopie	15
5.2. Kernresonanzspektroskopie	15
6. Syntheseverfahren	19
6.1. Reduktion mit Natriumborhydrid	19
6.2. Acetylierung mit Acetanhydrid	19
6.3. Synthese von [5- ¹³ C]Strictosidin ([5- ¹⁴ C]Strictosidin)	19
6.4. Darstellung von Strictosidinlactam	20
6.5. Synthese des Aldehyd-Sprühreagenz	20
7. Enzymtests	21
7.1. Strictosidin-Synthase	21
7.2. Unspezifische β -Glucosidasen	21
8. Proteinbestimmung	21

	Seite
9. Herstellung eines pflanzlichen Protein- rohextraktes	21
9.1. Enzymisolierung aus Zellkulturen	21
9.2. Enzymisolierung aus differenzierten Pflanzen	22
10. Alkaloidisolierung aus pflanzlichen Zellkul- turen	22
III. E R G E B N I S S E	23
A. Zelluläre Intermediatsynthese	23
1. Isolierung von Secologanin aus Blättern von <u>Lonicera xylosteum</u>	23
1.1. Vereinfachtes Verfahren zur Secologanin- gewinnung	25
1.1.1. Analytischer Nachweis von Secolo- ganin	25
1.1.2. Semipräparative Secologaniniso- lierung	28
1.1.3. Präparative Secologaninisolierung	28
1.2. Identifizierung der isolierten Glycoside	34
2. Raucaffricinisolierung aus <u>R.serpentina</u> Zell- suspensionskulturen	36
2.1. Revision der Raucaffricinstruktur	37
2.1.1. Physikochemische Eigenschaften von Raucaffricin, isoliert aus <u>R.serpen- tina</u> Zellsuspensionskulturen	38
2.1.2. Chemische Hydrolyse von Raucaffricin	38
2.1.3. Enzymatische Raucaffricinspaltung	39
2.1.4. NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Raucaffricinstruktur	39
2.2. <u>R.serpentina</u> Zellkulturen als ertragreich- ste Quelle für Raucaffricin	51
2.2.1. Vorkommen von Raucaffricin in Zell- kulturen und in differenzierten Pflanzen	51
2.2.2. Steigerung der zellulären Raucaffri- cinproduktion in <u>R.serpentina</u> Zell- suspensionskulturen	52

	Seite
2.3. Präparative Raucaffricinisolierung durch Rotation Locular Countercurrent Chroma- tography (RLCC)	56
3. Strictosidin-Akumulation in <u>R.serpentina</u>	57
3.1. Optimierung der Strictosidinanreicherung in <u>R.serpentina</u>	57
3.2. <u>In vitro</u> Hemmversuche der Strictosidin β - D-glucosidasen	61
3.3. Präparative Trennung von Strictosidin und Raucaffricin mit RLCC	63
B. Enzymatische Intermediatsynthese	64
1. Präparative enzymatische Strictosidindarstellung mit immobilisierter Strictosidinsynthase	64
2. Enzymatische Synthese von Vomilenin aus Raucaff- ricin	66
2.1. Zellfreier Umsatz von Raucaffricin zu Vomilenin	66
2.2. Enzymtests für die Raucaffricin β -D-glu- cosidase	68
2.2.1. Raucaffricin β -D-glucosidase Test durch enzymatischen Nachweis der abgespaltenen Glucose	69
2.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatogra- phischer (HPLC) Test auf Raucaffri- cin β -D-glucosidase	70
2.3. Anreicherung der Raucaffricin β -D-glucosi- dase	71
2.3.1. Isolierung des Enzyms	71
2.3.2. Gelchromatographie an TSK 55-S	71
2.3.3. Fast Protein Liquid Chromatography- Ionenaustauschchromatographie (FPLC)	72
2.3.4. Enzymanreicherung durch HPLC	73
2.4. Charakterisierung der Raucaffricin β -D- glucosidase	75
2.4.1. Temperaturabhängigkeit	75
2.4.2. pH-Optimum	76

	Seite
2.4.3. Molekulargewichtsbestimmung	77
2.4.4. Ermittlung des isoelektrischen Punktes	78
2.4.5. Einfluß der Substratkonzentration	78
2.4.6. <u>In vitro</u> Hemmung der Raucaffricin-glucosidase	80
2.4.7. Taxonomische Verbreitung	82
2.4.8. Substratspezifität	84
2.4.9. Enzymstabilität	84
2.5. Präparative zellfreie Vomileninsynthese	86
3. Enzymatische Raucaffrinolinsynthese aus Perakin	88
3.1. Enzymatische Perakinreduktion	88
3.2. Überprüfung der enzymatischen Perakin-darstellung	90
C. Biomimetisch orientierte Synthesen	94
1. Synthese N-analoger Heteroyohimbine	96
1.1. Synthese und Isomerentrennung	96
1.2. Struktur der Reaktionsprodukte	97
1.3. Allgemeine Anwendbarkeit der biomimetischen Aminkondensation	104
2. Nacyclinsynthese aus Strictosidin	106
2.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen	106
2.2. Spektroskopische Identifizierung	108
3. Pharmakologische Prüfung	110
3.1. Einsatz von Rezeptorbindungsstudien	110
3.2. <u>In vivo</u> Testergebnis	112
4. Chemisch-enzymatische Raucaffricinstruktur-modifikationen	112
4.1. Zugang zu neuen Sarpagan-Alkaloiden	112
4.2. Derivatisierung am Ajmalan-System	117
4.3. NMR-spektroskopische Bestimmung der Stereochemie der Reduktionsprodukte	121
5. Vomilenin als Syntheseausgangsprodukt	125
5.1. Spektroskopische Daten von Vomilenin	125
5.2. Umlagerung von Vomilenin zu Perakin	130
5.2.1. NMR-spektroskopische Untersuchung der Perakinstruktur	130

	Seite
5.2.2. Chemische Perakinreduktion	131
5.2.3. Aldehyd-Aminkondensation am Pera- kinmolekül	135
6. Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudien	136
D. Anhang	138
<u>In vivo</u> NMR-Experimente	138
1. Voraussetzungen für <u>in vivo</u> NMR-spektroskopi- sche Untersuchungen mit <u>R.serpentina</u> Zellen	138
2. Fütterungsversuche mit [5- ¹³ C]Strictosidin	140
IV. D I S K U S S I O N	144
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	158
VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	163

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BB	Breitbandenkoppelt
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Ci	Curie ($3.7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
COSY	correlated spectroscopy
D	Deuterium
DCI	Direkte chemische Ionisation
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	desintegrations per minute (Zerfallsrate)
EI	Elektronenstoß Ionisation
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
FMS	Fließmittelsystem
HETCOR	heteronuclear correlated spectroscopy
IC_{50}	halbmaximale Hemmkonzentration am Rezeptor
J	Kopplungskonstante
kat	Katal (1 kat entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
KPi	Kaliumphosphat
M^+	Molekularpeak
MeOH	Methanol
MG_{rel}	relatives Molekulargewicht
MSH	β -Mercaptoethanol
NOE	Nuclear Overhauser Effect
ppm	parts per million
TG	Trockengewicht
THA	Tetrahydroalstonin
Upm	Umdrehungen pro Minute

I. E I N L E I T U N G

In Europa und den USA entfallen etwa 50 Prozent aller therapeutisch eingesetzter Arzneistoffe auf biogene Wirkstoffe wie Antibiotika, Alkaloide, Hormone oder Vitamine (BAERHEIM SVENDSEN 1984). Naturstoffe spielten schon immer als Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Arzneimittel eine überaus wichtige Rolle (siehe Tab.1).

Naturstoff	Arzneistoff
Acetylcholin	Carbachol
Adrenalin	Isoprenalin
Atropin	Benzatropin
Chinin	Chloroquin
Cocain	Procain
Ephedrin	Amphetamin
Morphin	Pethidin
Physostigmin	Neostigmin
Salicin	Acetylsalicylsäure
Scopolamin	Buscopan
Tubocurarin	Decamethoniumbromid

Tab.1 : Naturstoffe als Leitsubstanzen der Arzneistoffentwicklung

Vor diesem Hintergrund stehen heute viele altbewährte Heilpflanzen aus allen Kulturkreisen, mehr als je zuvor, im Zentrum des Interesses. In erster Linie gilt die Suche hierbei neuen Wirkstoffen, die in natürlicher oder modifizierter Form die Arzneimitteltherapie bereichern können.

Zu den nach wie vor am preisgünstigsten aus Pflanzen isolierten Arzneistoffen zählen vor allem Secale-, Rauwolfia- und Vinca-Alkaloide sowie die herzwirksamen Digitalis-Glycoside. Für die dimeren Indolalkaloide Vincristin und Vinblastin ist die Extraktion aus Catharanthus roseus Blättern trotz einer Ausbeute von nur 2mg/kg Drogen immer noch wirtschaftlicher als deren Synthese (CZYGAN 1985). Ein wesentliches Ziel moderner Arzneimittelforschung ist deshalb die Entwicklung neuer Methoden zur Bereitstellung von Wirkstoffen. Die Grenzen zwischen biogenen und synthetischen Arzneistoffen verschwinden dabei mehr und mehr. Das einzige Kriterium wird in der Zukunft die Effizienz des Herstellungsverfahrens darstellen.

Eine allgemeine Tendenz bei chemischen Arzneistoffsynthesen ist der Einsatz von kostengünstigen optisch aktiven Startverbindungen wie z.B. Monosacchariden (vgl. Übersicht bei NUHN 1985). Partialsynthetische Umwandlungen von Naturstoffen werden bereits seit vielen Jahren bei Steroiden industriell durchgeführt (PETERSON et al. 1952).

Die biotechnologische Arzneistoffproduktion steht sicher erst am Anfang ihrer Entwicklung und auch erste spektakuläre Erfolge der Gentechnologie sind auf diesem Gebiet zu verzeichnen. Seit 1983 ist gentechnologisch hergestelltes Humaninsulin auf dem Markt. Die kommerzielle Produktion eines Naturstoffes mit pflanzlichen Zellkulturen hat mit dem Shikonin in Japan einen Durchbruch erzielt (FUJITA et al. 1981).

Dieses Naphtochinonderivat wird aufgrund seiner antibakteriellen und antiphlogistischen Wirkungen in der Dermatologie eingesetzt. In der UDSSR scheinen derzeit entsprechende Anstrengungen bezüglich der Produktion von Ginsengsaponinen mit pflanzlichen Zellkulturen positiv zu verlaufen (siehe hierzu LUCKNER 1985). Auch bei der Suche nach neuen, noch unbekannten Wirksubstanzen sind pflanzliche Zellkulturen ein wichtiges Instrument geworden. ALFERMANN berichtete 1985, daß derzeit 30 bis 40 neue Metabolite in Zellkulturen entdeckt worden sind, die in den entsprechenden Ausgangspflanzen noch nicht aufgefunden wurden (ALFERMANN 1985). So konnten aus Voacanga africana Zellsuspensionen erstmals die dimeren In-

dolalkaloide Voaftrin A und B isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden (STÖCKIGT et al. 1983) (Abb.1).

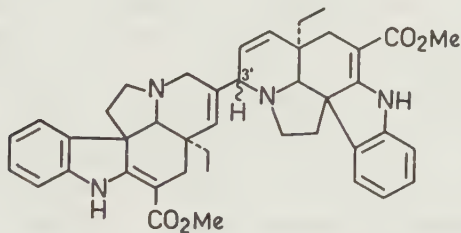


Abb.1 : Voaftrin A (3'α) und B (3'β), die ersten dimeren Indolalkaloide aus pflanzlichen Zellkulturen

Andererseits hat die Biosyntheseforschung mit pflanzlichen Systemen seit dem Einsatz von Zellkulturen enorme Impulse erhalten. Wichtige Schlüsselenzyme der Biogenese von Flavonoiden (HAHLBROCK und GRISEBACH 1975), Chinolizidin-(WINK und HARTMANN 1982), Isochinolin-(ZENK 1985) und Indolalkaloiden (ZENK et al. 1977, STÖCKIGT 1980) wurden aus Zellkulturen isoliert und charakterisiert. Die Untersuchungen von PFITZNER und STÖCKIGT erlauben ein experimentell abgesichertes Biosyntheschema für Alkaloide des Ajmalan/Sarpagan-Typs aufzustellen (Abb.2).

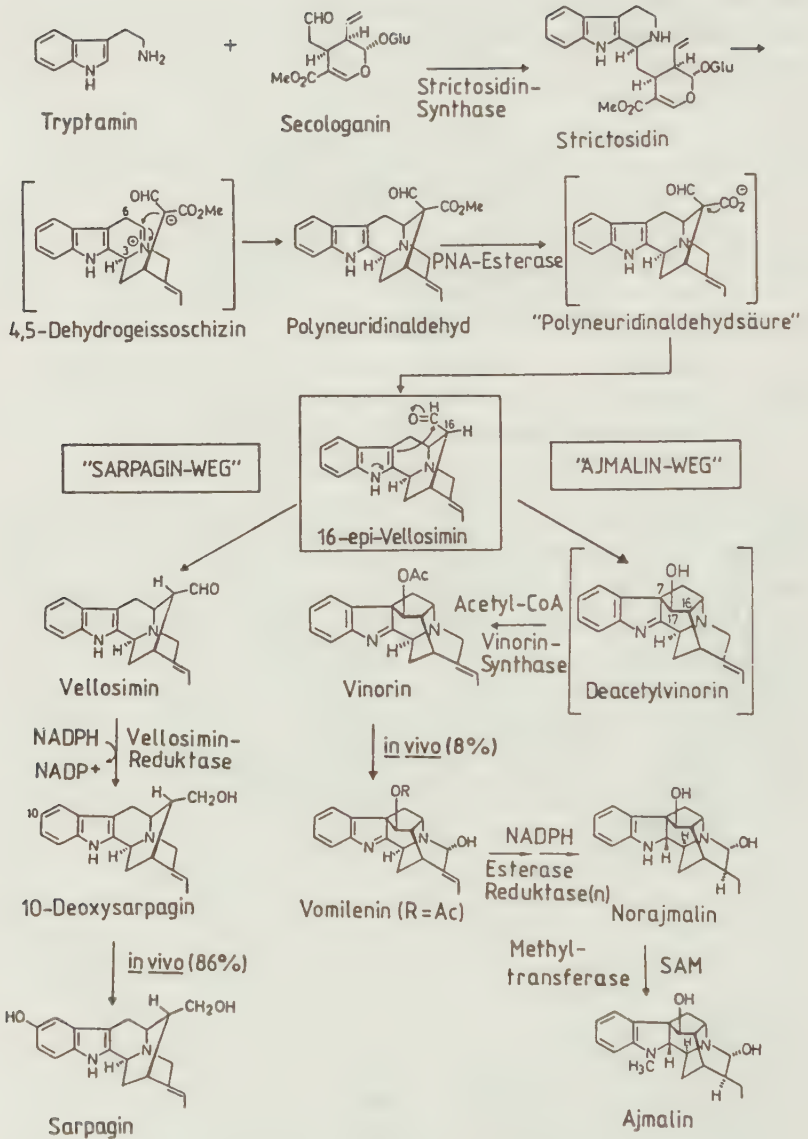


Abb.2 : Biosyntheseschema von Alkaloiden des Ajmalan-Sarpagan-Typs, nach PFITZNER (1984)

Die zentrale Stellung des Glucoalkaloids Strictosidin in der (Indol)-Alkaloidbiosynthese wurde von ZENK und STÖCKIGT aufgeklärt (STÖCKIGT und ZENK 1977a). Fütterungsexperimente bewiesen den Strictosidineinbau in alle bekannten Grundgerüste der monoterpenoiden Indolalkaloide sowie biogenetisch verwandte Alkaloidstrukturen (STÖCKIGT et al. 1977b, RÜFFER et al. 1978, NAGAKURA et al. 1979, HUTCHINSON et al. 1979)(Abb.3).

Neben der strukturellen Komplexität zeichnet die Indolalkaloide, wie kaum eine andere Naturstoffgruppe, ein breites Spektrum an pharmakologischen Eigenschaften aus. Viele Vertreter dieser Alkaloidklasse wurden seit langem in der Volksmedizin angewandt und sind heute als wirksame Prinzipien traditioneller Heilpflanzen erkannt worden. Von den therapeutisch eingesetzten Indolalkaloiden sind die Cytostatika Vincristin und Vinblastin an erster Stelle zu nennen. Durch Kombination mit Prednison ist es gelungen, die Erfolgsquote bei der akuten Leukämie von Kindern bis auf 90% zu steigern, dem bislang größten Erfolg bei der chemotherapeutischen Behandlung einer Krebsart (siehe Übersichtsartikel von NEUSS 1980). Die blutdrucksenkenden Eigenschaften von Reserpin und Ajmalicin besitzen ebenso medizinische Bedeutung wie das Antiarrhythmikum Ajmalin. Vincamin findet vor allem bei cerebralen Durchblutungsstörungen in der Geriatrie Verwendung. Auch vollkommen neue pharmakologische Wirkungen der Indolalkaloide wurden in den letzten Jahren entdeckt. BERETZ et al. (1985) registrierten eine signifikante Thrombocytenaggregationshemmung durch Polyindole. Verschiedene β -Carbolinderivate zeigten inhibierende Eigenschaften der c-AMP-Phosphodiesterase (SUNG et al. 1984). Der gleiche Wirkungsmechanismus wird bei neueren synthetischen, nicht glycosidischen Cardiotonika mit positiver Wirkung auf die Sauerstoffbilanz des Herzens beobachtet (BRISTOL und EVANS 1983). Das Interesse, das die Indolalkaloide aufgrund ihrer bemerkenswerten pharmakologischen Eigenschaften genießen, hat andererseits Chemiker immer wieder zu Totalsynthesen dieser komplexen Strukturen herausgefordert (WOODWARD et al. 1954,

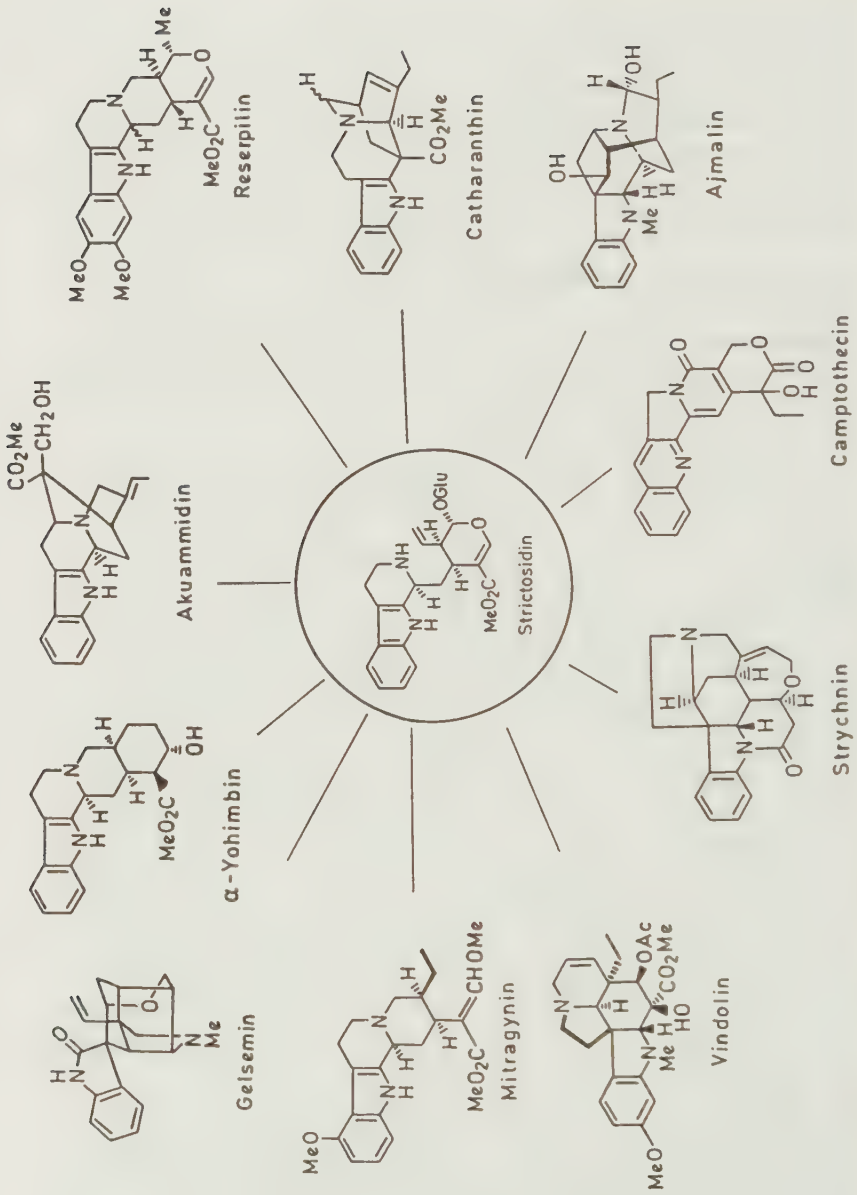


Abb.3 : Strictosidin, die universelle Vorstufe für Indolalkaloide und biogenetisch verwandte Alkaloidstrukturen

WOODWARD et al. 1956). WOODWARD synthetisierte polycyclische Alkaloide wie Reserpin und Strychnin durch aufeinanderfolgende Anellierung einzelner Ringsysteme (vgl. Übersicht bei WHEELER 1984).

Neben diese erfolgreich angewandte Strategie (MAGNUS et al. 1983) ist ein weiteres Konzept für die Synthese von Naturstoffen getreten. Durch Nachahmung biosynthetischer Reaktionsabläufe in vitro können oftmals durch wenige Syntheseschritte die gewünschten Wirkstoffe hergestellt werden. BRESLOW prägte für dieses Vorgehen 1972 den Ausdruck "biomimetische Synthese" (BRESLOW 1972, BRESLOW 1980).

Dieses Reaktionsprinzip ist in eindrucksvoller Weise in der Progesteronsynthese von JOHNSON realisiert (JOHNSON et al. 1971, JOHNSON 1976). Analog der Biosynthese von cyclischen Triterpenen aus Squalen ging JOHNSON dabei so vor, daß er trans-Polyene mit einer reaktiven Startgruppe stereospezifisch zu einem Fünfringsystem verknüpfte (Abb.4).

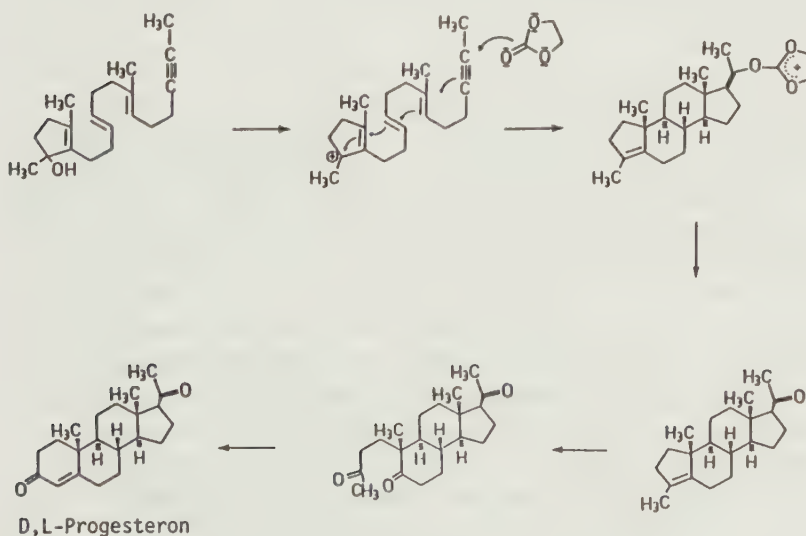


Abb.4 : Biomimetische Progesteronsynthese, nach JOHNSON (1976)

Prostaglandine, deren Darstellung mit stets neuen Konzeptionen betrieben wurde, konnten 1984 gezielt, ebenfalls biomimetisch, von COREY et al. (1984) synthetisiert werden. Auch in diesem Fall lehnt sich die Reaktion eng an das Biogeneschema an.

Ein wichtiges Charakteristikum dieser Synthesestrategie ist die zentrale Stellung polyfunktioneller Schlüsselverbindungen. BROWN wählte erfolgreich das Iridoidglucosid Secologanin als Startmolekül für Indolalkaloidsynthesen aus (siehe hierzu Übersichtsartikel von TIETZE 1983 und BROWN 1983). Im Arbeitskreis von ZENK ist es 1982 gelungen, das Schlüsselenzym der Indolalkaloidbiosynthese, die Strictosidinsynthese (Abb.2), zu immobilisieren (U.PFITZNER und ZENK 1982). Mit Hilfe dieses trägerfixierten Sekundärstoffenzym ist Strictosidin im präparativen Maßstab synthetisierbar. Aufgrund der mannigfaltigen Umlagerungsmöglichkeiten des Stoffwechselintermediats Strictosidin war es eine reizvolle Aufgabe, auch dieses Alkaloid als Ausgangssubstanz für biomimetische Reaktionen einzusetzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Verfahren zur Bereitstellung größerer Mengen an Naturstoff-Vorstufen entwickelt werden. Eine weitere Zielsetzung bestand in der Derivatisierung reaktiver Stoffwechselintermediate, wie z.B. Strictosidin, durch kombinierten Einsatz chemischer und enzymatischer Methoden. Pflanzliche Zellkulturen sollten hierbei einerseits zur Enzymisolierung dienen, andererseits war zu prüfen, ob sie auch als Quelle hochreaktiver Intermediate geeignet sind. Aus enzymatisch hergestellten und zellulär gebildeten Biosynthesevorstufen sollte durch möglichst einfache Reaktionsfolgen der Zugang zu neuen pharmazeutisch interessanten Alkaloidabkömmlingen erreicht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

1.1. Differenzierte Pflanzen

Die Pflanzen von Rauwolfia verticillata Chevalier und Catharanthus roseus G.Don wurden im Gewächshaus bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C im natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Lonicera xylosteum L.-Blätter stammten von Sträuchern aus der Umgebung Münchens.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Zellsuspensionskulturen wurden in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit je 250 ml Nährmedium auf Rotationsschüttlern (100 UpM) bei 22-24°C und Dauerlicht (600 Lux) angezogen. Als Inoculum diente jeweils ca. 30 ml Zellmasse. Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen nach 14-20 Tagen abgeerntet. Nach Abtrennung des Kulturmediums durch Vakuumfiltration wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -26°C gelagert. Zur Bereitstellung größerer Gewebemengen (10-20 kg Frischgewicht) wurden Fernbachkolben mit jeweils 1 l Nährlösung eingesetzt.

Folgende Nährmedien fanden für die Anzucht der Zellkulturen Verwendung:

LS	nach LINSMAIER und SKOOG (1965)
DAX	nach GAMBORG <u>et al.</u> (1968), modifiziert wie von ZENK <u>et al.</u> (1975) publiziert
4X	nach GAMBORG <u>et al.</u> (1968), modifiziert nach ULBRICH und ZENK (1979)
AP	nach ZENK <u>et al.</u> (1977)
AP1	modifiziertes AP Medium (100g Saccharose/l)
AP2	mod. AP Medium (2.5g MgSO ₄ , 100g Sacch./l).

Für die in vivo NMR-Experimente wurde ein Minimalmedium eingesetzt. (= AP Medium ohne paramagnetische Salze).

1.3. Quantitatives Animpfen bei Medienoptimierung

Die Zellen wurden nach 8-tägigem Wachstum im LS-Medium unter sterilen Bedingungen von der Nährlösung befreit. Das quantitative Animpfen erfolgte durch Entnahme gleicher Volumenteile des Zellmaterials bzw. Wägung der Kolben mit und ohne Inoculum.

1.4. Frisch- und Trockengewichtsbestimmung

Durch Filtration mit einem Büchnertrichter wurde das Pflanzengewebe vom Nährmedium abgetrennt und gewogen. Zur Ermittlung des Zelltrockengewichts wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefrieretrocknet.

2. Chemikalien

Als Referenzalkaloide wurden Raucaffricin und Tetrahydroalstonin von der Firma ROTH (Karlsruhe) bezogen. $K^{13}CN$ lieferte die Firma AMERSHAM-BUCHLER, $NaBD_4$ (98%) sowie deutериerte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie MERCK, SHARP und DOHME (München). Ultrogel AcA 44, AcA 54 wurden von LKB (Bromma, Schweden), Sephadex G-25 von PHARMACIA (Uppsala, Schweden), das TSK 55-S Material von MERCK (Darmstadt) bezogen. Alle anderen eingesetzten Lösungsmittel und Chemikalien stammten aus den üblichen Quellen und waren von größtmöglicher Reinheit.

3. Geräte

UV-Spektren wurden in Methanol an einem 551 S UV/VIS-Spektrometer von PERKIN-ELMER gemessen. Lösungsmittel war stets MeOH. Die Bestimmung der optischen Drehung erfolgte mit dem PERKIN-ELMER Polarimeter 241 in einer 1 ml Küvette.

Infrarotspektren wurden als KBr-Preßlinge mit dem IR-Gitterspektrometer 257 der Firma PERKIN-ELMER erhalten.

Massenspektren wurden mit einem FINNIGAN MAT 44 S Massenspektrometer mit kombinierter EI/CI-Einrichtung gemessen (70 eV/ 180 eV).

Zur Proteinisolierung diente eine Chromatographiestation der Firma LKB bestehend aus Multirac, Uvicord S II, Microperpex Peristaltic Pump und Copper Bar Recorder sowie das FPLC-System der Firma PHARMACIA. Herrn R. Feicht (Garching) danke ich für die Durchführung der FPLC-Chromatographie. Für HPLC-Messungen stand eine SPECTRA PHYSICS-Anlage zur Verfügung mit SP 4100 Computer-Integrator, SP 8440 UV/VIS Detektor, SP 8700 Pumpensteuerung und einem automatischen Probengeber ASI-150.

Radioaktivitätsmessungen wurden am Betaszint BF 5000 Szintillationszähler der Firma BERTHOLD durchgeführt. Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit dem BERTHOLD Dünnschichtscanner LB 2722-2 ermittelt.

Gefriertrocknungen im Labormaßstab erfolgten mit einer EDWARDS Gefriertrocknungsapparatur. Für präparative Zwecke (10 kg Frischgewicht) konnte die Anlage CHRIST-Epsilon II benutzt werden.

Zur Säulenniederdruckchromatographie wurde eine Duramat D1 Dosierpumpe von CFG-PROMINENT (Heidelberg) verwendet.

Die Flüssig-Flüssig Verteilungschromatographie erfolgte mit der RLCC-Anlage der Firma ZINSSER (Frankfurt) sowie dem DCC-Chromatographen B-670 der Firma BÜCHI (Flawil, Schweiz).

NMR-Spektren wurden mit Geräten der Firma BRUKER, NICOLET und VARIAN gemessen. Die Feldstärken betrugen 200, 300, 360 und 400 MHz. Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben.

4. Chromatographische Verfahren

4.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Substanztrennung erfolgte mit Kieselgel DC-Fertigplatten Sil G/UV 254 der Firma MACHERY und NAGEL bei Kammersättigung.

Folgende Fließmittelsysteme (FMS) kamen zur Anwendung:

FMS 1	Aceton : CHCl_3 : H_2O	= 16 : 4 : 1
FMS 2	CHCl_3 : MeOH : NH_3	= 90 : 10 : 0.1
FMS 3	Aceton : Petroläther : Diethylamin	= 2 : 7 : 1
FMS 4	CHCl_3 : MeOH : H_2O	= 32 : 25 : 5
FMS 5	n-Butanol : Aceton : H_2O	= 2 : 1 : 1
FMS 6	CHCl_3 : MeOH	= 4 : 1
FMS 7	CHCl_3 : MeOH : Diethylamin	= 4 : 1 : 0.1
FMS 8	CHCl_3 : Toluol : MeOH	= 5 : 3 : 2
FMS 9	CHCl_3 : MeOH : Diethylamin	= 5 : 1 : 0.1
FMS 10	Aceton : n-Hexan : Diethylamin	= 2 : 7 : 1
FMS 11	n-Hexan : Essigester : MeOH	= 1 : 1 : 1
FMS 12	n-Hexan : Essigester : MeOH	= 2 : 9 : 9
FMS 13	CHCl_3 : MeOH : NH_3	= 100 : 3 : 0.1

Die Detektion der Alkaloide erfolgte mit Ammonium-Cer(IV)-sulfat 5% in konz. Phosphorsäure. Glucosidierte Verbindungen und Zucker wurden mit einer Mischung von 2 g Anilin, 10 ml Phosphorsäure, 2 g Diethylamin in 190 ml Aceton detektiert. Secologanin wurde mit dem Reagenz nach DICKINSON und JACOBSEN (1970) nachgewiesen.

4.2. Säulenchromatographie

Zur Vorreinigung pflanzlicher Rohextrakte wurde die präparative Kieselgel-Säulenchromatographie eingesetzt. Als Füllmaterial diente Kieselgel 60 der Firma MERCK (Korngröße < 0.063 mm). Neben der hydrostatischen Säulenchromatographie wurden im geschlossenen System mit dem gleichen Trägermaterial Niederdrucktrennungen mit einer Pumpe durchgeführt.

4.3. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytischen HPLC-Messungen von Pflanzeninhaltsstoffen erfolgten mit einer Hibar LiChroCart (RP-18) Säule (0.4 x 25 cm) der Korngröße 7 μm von MERCK. Für präparative Zwecke kam eine Trennsäule von MACHERY und NAGEL, Nucleosil 7C RP (1.0 x 25 cm) zur Anwendung. Zur HPLC-Trennung von Enzympräparationen und Molekulargewichtsbestimmungen wurde eine

Fractogel TSK G-3000 SW Säule der Firma LKB eingesetzt.

4.4. Flüssig-Flüssig Verteilungschromatographie

Das Trennprinzip der Tropfen-Gegenstrom-Chromatographie (DCCC = Droplet Countercurrent Chromatography) beruht auf der Verteilung eines Substanzgemisches zwischen Tropfen einer mobilen Phase und einer flüssigen stationären Phase (TANIMURA et al. 1970). Je nach Dichteunterschied der beiden flüssigen Phasen kann die Chromatographie sowohl ab- als auch aufsteigend betrieben werden (siehe Abb. 5A).

Eingesetzt wird diese Methode vor allem für die Trennung polarer Naturstoffe im Milligramm-Bereich (HOSTETTMANN et al. 1979).

Für größere Probendurchsätze wurde die nach dem gleichen Prinzip arbeitende RLCC-Anlage (siehe Abb. 5B) verwendet (RLCC = Rotation Locular Countercurrent Chromatography) (siehe SNYDER et al. 1984).

Das RLCC-Gerät besteht aus 16 in Reihe geschalteten Glas-säulen (50 x 1.1 cm), die durch perforierte Teflonscheiben in einzelne Kompartimente unterteilt sind. Die Säulen sind kreisförmig um eine gemeinsame Achse angeordnet und werden in geneigter Stellung (ca. 30°) gedreht. In jeder Zelle bildet sich ein Zweiphasensystem aus. Je nach Trennproblem wird entweder die leichtere oder die schwerere Phase als Elutionsmittel eingesetzt.

Der große Vorteil beider Verfahren liegt darin, daß die aufgegebene Probe vollständig zurückgewonnen werden kann. Da keine Festkörper-Trägermaterialien verwendet werden findet daher auch keine irreversible Adsorption statt.

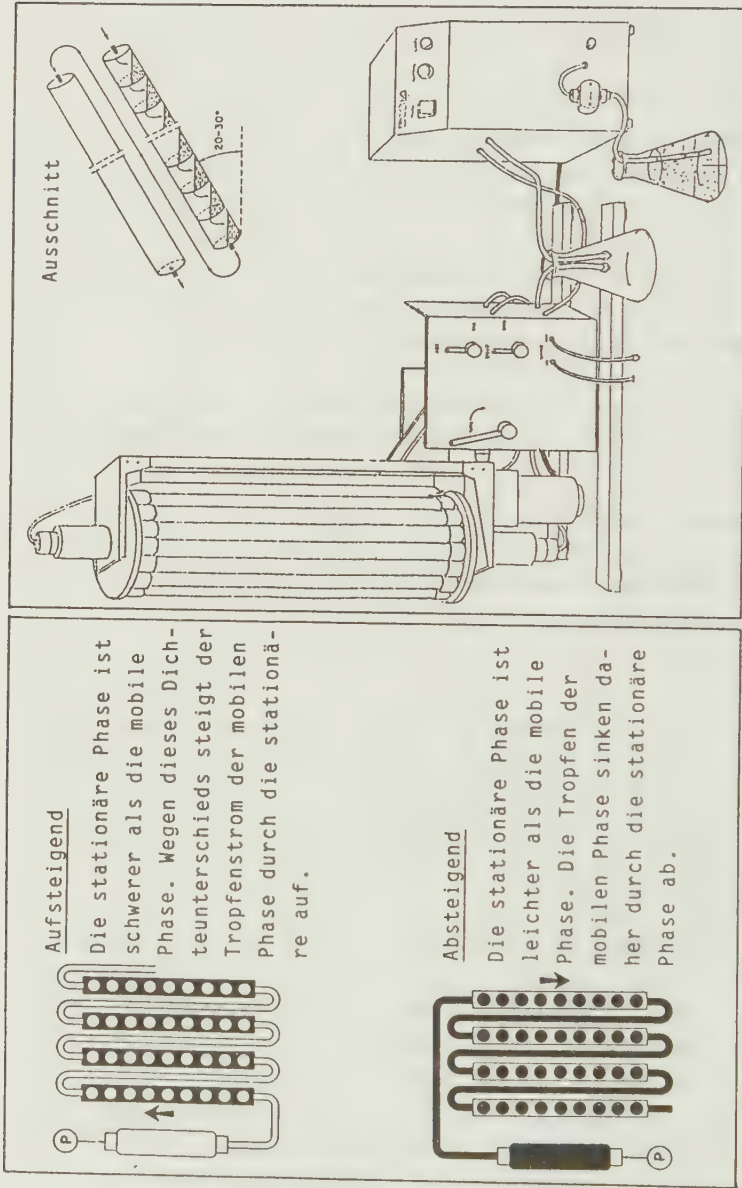


Abb. 5 A : Prinzip der DCCC-Trennung
DCCC (Droplet Countercurrent Chromatography)

Abb. 5 B : Aufbau einer RLCC-Anlage
RLCC (Rotation Locular Countercurrent Chromatography)

5. Spektroskopische Methoden

5.1. Massenspektroskopie

Routinemäßig wurden die Massenspektren unter EI-Bedingungen (Elektronenstoß-Ionisation) aufgenommen. Alkaloidsalze wurden vorher in die entsprechenden freien Basen überführt.

Für glucosidische Substanzen kam das DCI-Verfahren zur Anwendung (Direkte Chemische Ionisation). Dieses schonende Ionisierungsverfahren ermöglicht auch bei schlecht verdampfenden Substanzen in vielen Fällen die Ermittlung des Molekulargewichts. Als Reaktantgas diente ausschließlich Isobutan.

5.2. Kernresonanzspektroskopie

Der Einsatz moderner supraleitender Magnete mit Feldstärken von 200-500 MHz bewirkt neben dem Empfindlichkeitsgewinn auch eine verbesserte Signalseparierung, da die Differenz der Resonanzfrequenzen proportional zur Magnetfeldstärke ist.

Während im Continuous Wave (CW)-Meßverfahren die eingestrahlte Radiofrequenz kontinuierlich verändert wurde, bringt man in der Pulstechnik alle Atomkerne gleichzeitig in Resonanz. Die Abgabe der durch Anregung der Kerne aufgenommenen Energie wird als Abklingkurve verfolgt und in ein interpretierbares Frequenzspektrum umgerechnet. Das hierzu benötigte mathematische Verfahren ist die Fourier-Transformation (FT), sodaß diese Detektionsmethode kurz als FT-NMR-Spektroskopie bezeichnet wird.

Grundlage aller neuen Pulstechniken ist die Einteilung des NMR-Experiments in eine Präparations-, Evolutions- und Detektionsphase (siehe Übersicht bei BENN und GÜNTHER 1983). Im Gegensatz zur eindimensionalen Methode wird bei der zweidimensionalen (2D-) NMR-Spektroskopie die Evolutionszeit in einer Folge von Pulscyclen als Variable behandelt.

Für die graphische Darstellung der 2D-NMR-Spektren sind zwei Verfahren üblich: Das Konturdiagramm (Contour plot, Abb. 6A) und die Panoramadarstellung (stacked plot, Abb. 6B).

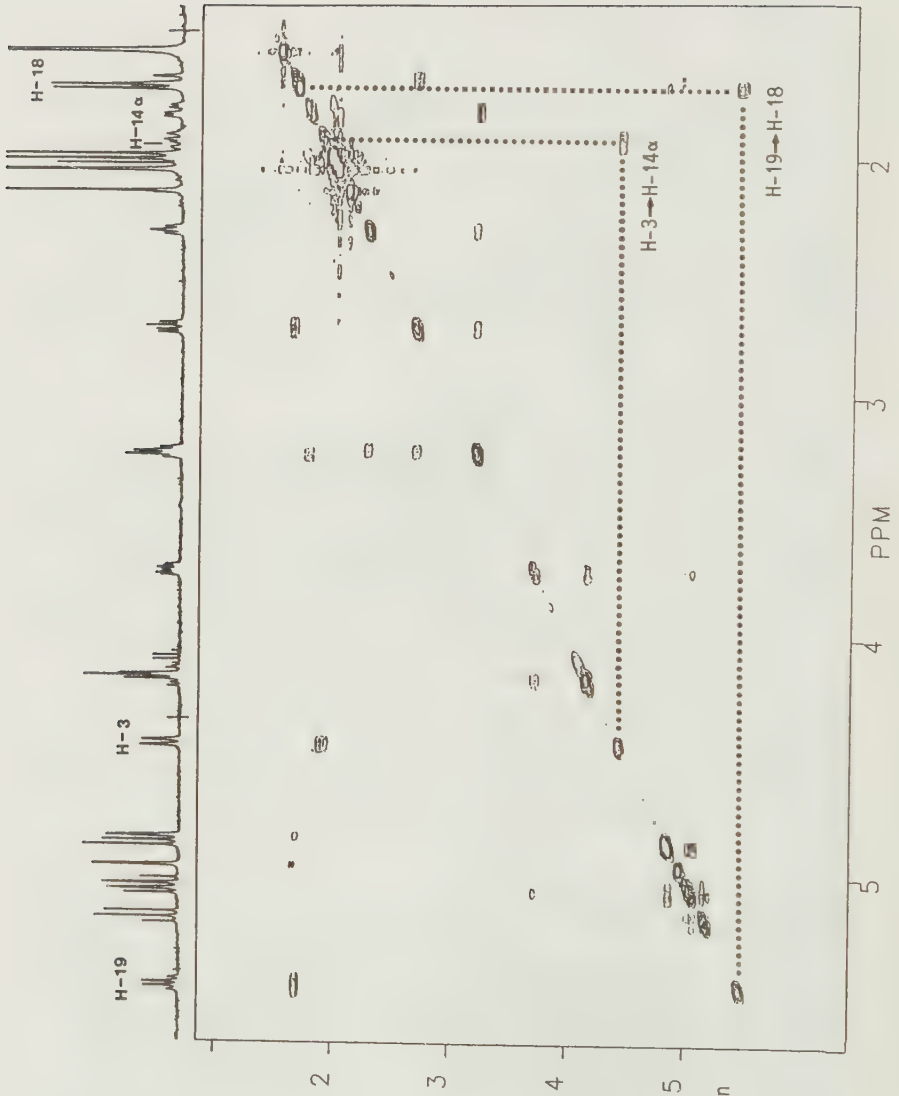


Abb. 6 A :

2D-COSY-Spektrum

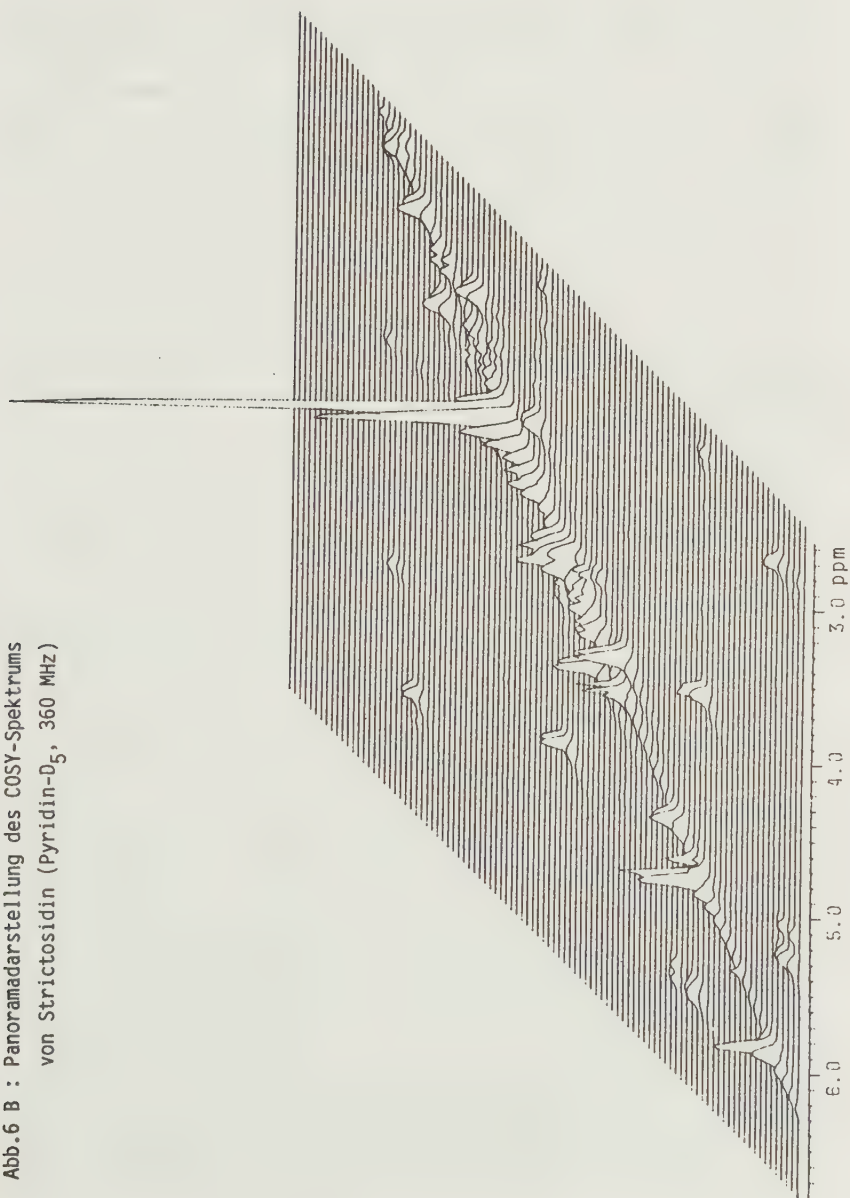
Konturdiagramm

Acetylraucafricin

in CDCl_3

(400 MHz)

Abb.6 B : Panoramadarstellung des COSY-Spektrums
von Strictosidin (Pyridin-D₅, 360 MHz)



Beim Konturdiagramm handelt es sich um einen zur xy-Ebene der gestaffelten Darstellung parallelen Schnitt, dessen Höhe beliebig gewählt werden kann. Das Resultat ist ein übersichtliches Höhenliniendiagramm in dem sich das normale eindimensionale Spektrum auf der Diagonalen befindet. Konturen außerhalb der Diagonalen, crosspeaks genannt, zeigen eine homonucleare Kopplung an. Durch die in Abb.6A eingezeichneten Verbindungslinien können die Kopplungspartner direkt aus dem COSY-Spektrum entnommen werden (COSY = correlated spectroscopy). Für Korrelationsspektren stellt diese Art der Auswertung eine wesentliche Erleichterung dar. Ein COSY-Experiment ersetzt deshalb zeitaufwendige Doppelresonanzmessungen, die somit lediglich bei Bestimmung der Kopplungskonstanten erforderlich werden.

Mit der zweidimensionalen heteronuclear korrelierten Spektroskopie (HETCOR = heteronuclear correlated spectroscopy) werden in einem Aufnahmeverfahren Kopplungen zweier verschiedener Kernsorten (z.B. ^1H und ^{13}C) registriert. Der Korrelations-Charakter der Methode ermöglicht bei bekannten Signallagen einer Kernart (^1H) die unmittelbare Zuordnung der anderen Kernsorte (^{13}C).

Die natürliche Häufigkeit von ^{13}C -Kernen beträgt nur 1.1%, die Empfindlichkeit ist um den Faktor 0.016 geringer im Vergleich zu ^1H -NMR-Messungen. Mit Hilfe des Polarisations-transfers (vgl. HESSE et al. 1984) gelingt es, die größere Populationsdifferenz einer empfindlichen (^1H) auf eine unempfindliche Kernsorte (^{13}C) zu übertragen. Die damit verbundene Signalverstärkung wird bei Aufnahme von DEPT-Serien ausgenutzt (DEPT = distortionless enhancement by polarization transfer). Zugleich erlaubt diese Meßtechnik Teilspektren zu registrieren, die nach der Signalmultiplizität selektiert werden können (CH , CH_2 , CH_3). Durch Messung des NOE-Effekts (NOE = Nuclear Overhauser Effect) kann geklärt werden, welcher von zwei Kernen a oder b innerhalb eines Moleküls mit einem Kern c eine sterische Wechselwirkung ausübt. Experimentell werden die Resonanzfrequenzen von a und b nach-

einander eingestrahlt und gleichzeitig die Intensitätsänderung des Kernes c verfolgt. Der größere Intensitätszuwachs wird für das Kernpaar beobachtet, das räumlich den geringeren Abstand besitzt.

Zur Probenvorbereitung für NOE-Experimente wurden die Lösungen vorher im NMR-Röhrchen durch 20-minütiges Einleiten von Helium oder Argon entgast.

6. Syntheseverfahren

6.1. Reduktionen mit Natriumborhydrid

Die Reduktionen erfolgten in methanolischer Lösung mit einem Überschuß von NaBH_4 . Nach 2-10 Stunden wurden die Ansätze mit H_2O verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert.

6.2. Acetylierung mit Acetanhydrid

Acetylierungen wurden stets mit einem Gemisch aus Acetanhydrid/Pyridin 1:1 ausgeführt. Nach 10-stündiger Reaktionszeit wurde das überschüssige Pyridin durch mehrmalige Benzolzugabe und Abrotieren im Vakuum entfernt.

Für den analytischen Nachweis wurden die Substanzen direkt im MS-Tiegel mit 5 μl Aceton/Pyridin acetyliert.

6.3. Synthese von $[5-^{13}\text{C}]\text{Strictosidin}$ ($[5-^{14}\text{C}]\text{Strictosidin}$)

Das hierzu notwendige $[1'-^{13}\text{C}]\text{Tryptamin}$ wurde in Anlehnung an HUTCHINSON et al. (1979) synthetisiert. Statt des vorgeschlagenen Graminmethojodids wurde das nach SCHÖPF und THESING (1951) leichter zugängliche Graminmethosulfat eingesetzt.

10 mg $[1'-^{13}\text{C}]\text{Tryptamin}$ (62 μMol) wurden mit 50 nkat immobilisierter Strictosidinsynthase (vgl. U.PFITZNER und ZENK 1982) in 20 Minuten quantitativ mit Secologanin zu $[5-^{13}\text{C}]\text{Strictosidin}$ umgesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C unter vorsichtigem Rühren im batch-Verfahren durchgeführt.

Nach der gleichen Methode erfolgte ausgehend von $[1'-^{14}\text{C}]\text{Tryptamin}$ die Synthese von $[5-^{14}\text{C}]\text{Strictosidin}$.

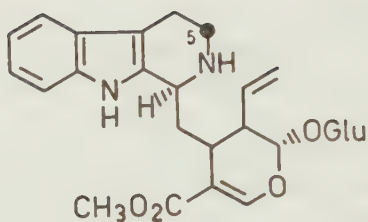


Abb.7 : [5-¹³C]Strictosidin ([5-¹⁴C]Strictosidin)

6.4. Darstellung von Strictosidinlactam

Die Synthese von Strictosidinlactam wurde nach BATTERSBY et al. (1969) ausgeführt. Das Lactam konnte in 71%iger Ausbeute durch alkalische Hydrolyse aus Strictosidin dargestellt werden.

6.5. Synthese des Aldehyd-Sprühreagenz

Als geeignetes Sprühmittel zur Detektion von Secologanin wurde nach KLÜSENER (1976) das von DICKINSON und JACOBSEN (1970) beschriebene 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto 1,2,4-triazol verwendet. Aus Thioharnstoff und Hydrazinhydrat wurde das Reaktionsprodukt in 32%iger Ausbeute erhalten.

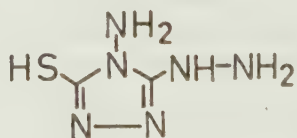


Abb.8 : Aldehyd-Nachweisreagenz, nach DICKINSON und JACOBSEN (1970)

7. Enzymtests

7.1. Strictosidin-Synthase

Die Messung der Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde nach U.PFITZNER und ZENK (1982) durchgeführt.

7.2. Unspezifische β -Glucosidasen

Die Bestimmung der unspezifischen β -Glucosidasen erfolgte wie bei HEMSCHEIDT (1983) angegeben.

8. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach BRADFORD (1976) ausgeführt. Als Standard zur Erstellung einer Eichgeraden diente Rinder-serumalbumin.

9. Herstellung eines pflanzlichen Proteinextraktes

9.1. Enzymisolierung aus Zellkulturen

100 g tiefgefrorenes Zellmaterial werden mit 200 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0, 10 mM MSH) bis zum Auftauen des Gewebes bei Raumtemperatur gerührt. Nach 45 Minuten wird die Zellmasse durch Mull gedrückt und der Preßsaft 20 Min. bei 20 000 x g abzentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine fällt man anschließend durch portionsweise Zugabe von Ammoniumsulfat, bis eine 70%ige Salzkonzentration erreicht war (Dauer ca. 30 Min.). Nach erneuter Zentrifugation (10 Min. 48 000 x g) wird das Sediment in maximal 10 ml des Aufschlußpuffers suspendiert. Danach wird erneut abzentrifugiert (5 Min. 48 000 x g). Der klare Überstand wird dann von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Hierzu kann entweder ein Dialyseschritt oder eine G-25 Gelfiltration eingesetzt werden.

9.2. Enzymisolierung aus differenzierten Pflanzen

10 g frisch geerntete Blätter werden mit flüssigem Stickstoff übergossen und in einer Reibschale zu einem feinen Gewebepulver vermahlen. Nach 30-minütigem Rühren in 20 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0, 10 mM MSH) wird durch Mull filtriert. Nach Zentrifugation (10 Min., 20 000 x g) werden die Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat (70% Endkonzentration) ausgefällt. Nach Zentrifugation (15 Min. 48 000 x g) wird der Niederschlag in 4 ml Aufschlußpuffer suspendiert und durch Dialyse von niedermolekularen Anteilen befreit.

10. Alkaloidisolierung aus pflanzlichen Zellkulturen

Das Zellgewebe wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Gefriertrocknung das Wasser entzogen. 100 g des Lyophilisats wurden anschließend mit 200 ml MeOH 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration erfolgte die Konzentrierung des methanolischen Rohextraktes im Vakuum.

Für die präparative Raucaffricinisolierung fand als Extraktionsmittel die organische Phase des Dreikomponentengemisches CHCl_3 - MeOH - H_2O = 43 : 37 : 20 Verwendung.

III. E R G E B N I S S E

A. Zelluläre Intermediatsynthese

1. Secologanin-Isolierung aus Blättern von Lonicera xylosteum

Alle Indolalkaloide leiten sich von der aromatischen Aminosäure Tryptophan, bzw. deren Decarboxylierungsprodukt Tryptamin ab (LEETE 1960, BATTERSBY et al. 1968). Als weiterer Baustein bei der Biosynthese monoterpenoider Indolalkaloide ist das Iridoidglycosid Secologanin erforderlich. Diese Substanz steht in engem strukturellen Zusammenhang mit Loganin, einem Cyclopentafclpyran-Derivat, dem unmittelbaren Vorläufer des Secologanins. Während durch Fütterungsexperimente die Transformation der Mevalonsäure zu Loganin bewiesen wurde (ESCHER et al. 1970, BATTERSBY et al. 1968), ist der Mechanismus der Cyclopentanringsspaltung zum Secologanin noch ungeklärt (vgl. Zusammenfassung bei CORDELL 1974) (siehe Abb. 9).

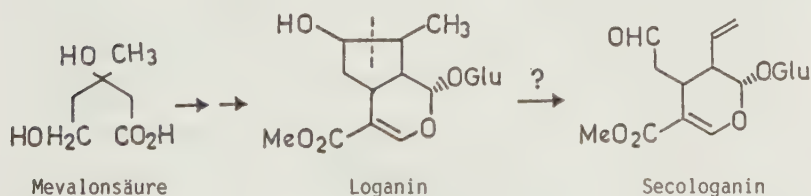


Abb.9 : Biosynthetische Vorläufer des Secologanins

Die Entwicklung eines Radioimmuntests, eine Methode, die von ZENK und WEILER in die Phytochemie eingeführt wurde (WEILER 1977) erlaubt heute die quantitative Erfassung von Loganin und Secologanin in biologischen Proben (TANAHASHI et al.

1984). Diese Bestimmungsmethode sollte es ermöglichen, neue Erkenntnisse der Umwandlung von Logenin in Secologanin zu gewinnen.

Secologanin, das 1969 erstmals durch radioaktive Verdünnungsanalyse in Catharanthus roseus Pflanzen nachgewiesen wurde (BATTERSBY et al. 1969) ist sicherlich eine der wichtigsten Schlüsselverbindungen der Alkaloidbiosynthese.

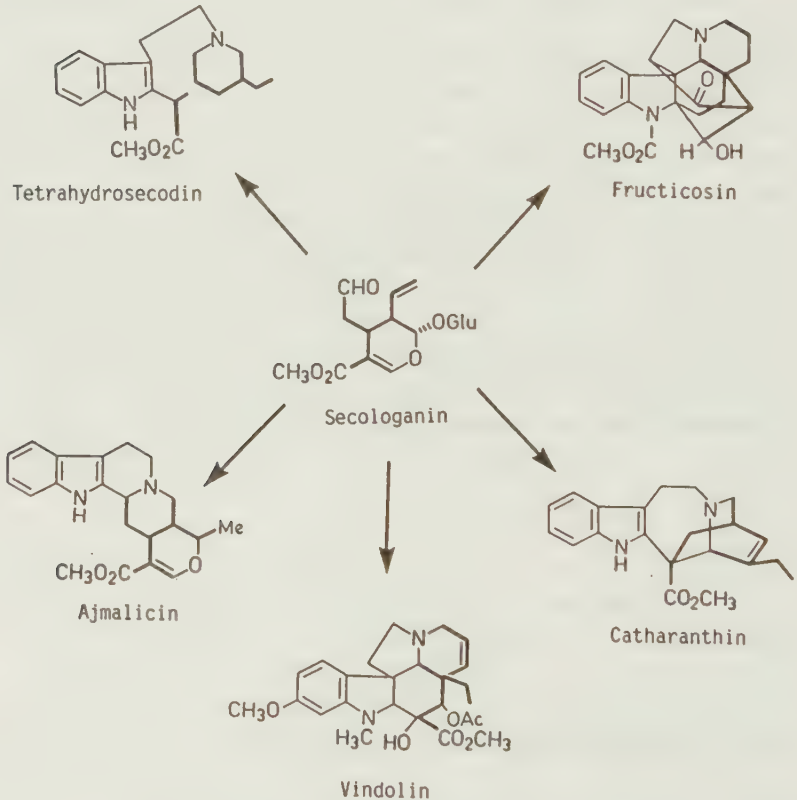


Abb.10 : Klassifizierung monoterpenoider Indolalkaloide aufgrund verschiedener Umlagerungsmöglichkeiten der Secologanin-einheit, nach KOMPIS et al.(1971), abgeändert

Monoterpenoide Indolalkaloide, deren Strukturvielfalt auf den ersten Blick unüberschaubar scheint, lassen sich klassifizieren aufgrund verschiedener Umlagerungsmöglichkeiten der Secologanineinheit (KOMPIS et al. 1971). In Abb.10 sind einige typische Vertreter dieser Alkaloidklasse aufgeführt.

In Anbetracht der strukturellen Vielfalt an Verbindungen, die sich biosynthetisch von Secologanin ableiten, wurden immer wieder Anstrengungen unternommen, das Iridoidglucosid in biomimetischen Reaktionen einzusetzen (für eine Übersicht siehe BROWN 1983). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit war Secologanin eine wichtige Ausgangsverbindung für weiterführende Synthesen. Da es trotz intensiver Bemühungen bis heute noch nicht gelungen ist, diesen reaktiven Naturstoff chemisch in zufriedenstellenden Ausbeuten zu synthetisieren (TIETZE 1974, KINAST et al. 1976) bietet sich nur pflanzliches Material zur Secologaningewinnung an (SOUZU et al. 1970).

So wurde in den vergangenen Jahren versucht, mit den verschiedensten Isolierungstechniken diesen begehrten Inhaltsstoff präparativ zu erhalten. Ausgangsmaterial waren in der Regel Blätter von Lonicera-Arten (Geißblattgewächse). Vor allem säulenchromatographische Methoden wurden eingesetzt mit Polyamid-, Celite- und Kieselgelmaterial (SOUZU et al. 1970, HUTCHINSON siehe KINAST et al. 1976). Daneben wurden aufwendige Ausschüttelverfahren entwickelt (SLEIGH, persönl. Mitteilung), alle mit dem Nachteil eines großen Zeitaufwands.

1.1. Vereinfachtes Verfahren zur Secologaningewinnung

1.1.1. Analytischer Secologaninnachweis

Durch Einsatz der HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ist es heute möglich, Pflanzenextrakte in relativ kurzer Zeit quantitativ nach gewünschten Inhaltsstoffen zu untersuchen. Zur analytischen Secologaninbestimmung wurde folgendes HPLC-Trennsystem eingesetzt:

Säule	Hibar LiChroCart, MERCK (0.4 x 25 cm)
Säulenmaterial	RP 18 (Korngröße 7 µm)
Fließmittel	Acetonitril/Wasser [10mM(NH ₄) ₂ CO ₃]
Gradient	5 : 95 → 62 : 38 in 40 min.
Flußrate	1 ml/min.
Detektion	250 nm

Mit dem oben angegebenen System ergibt sich für Secologanin eine Retentionszeit von 8.9 min.

In Verbindung mit einem automatischen Probengeber können auf diese Weise Reihenuntersuchungen mit verschiedenem Pflanzenmaterial auf Secologaninvorkommen und Gehalt durchgeführt werden.

Im Standardansatz wurden 0.5 g an der Luft getrockneter Blätter von Lonicera xylosteum L. (Gemeine Heckenkirsche, Geißblattgewächse) bei Raumtemperatur 48 Stunden mit 10 ml MeOH extrahiert. 100 µl des Auszugs wurden mit MeOH auf 1 ml verdünnt und nach 3-minütiger Zentrifugation mit HPLC analysiert. Alle unter A 1.1.3. beschriebenen Reinigungsschritte wurden nach diesem Verfahren quantifiziert.

Die jahreszeitlichen Schwankungen des Secologaningehaltes in L. xylosteum Blättern wurden nach der gleichen Methode bestimmt (siehe Abb. 11).

Hierzu wurden von vier verschiedenen Sträuchern (Herkunft: München, Englischer Garten) zu den angegebenen Zeiten Blattproben genommen. Diese wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und im Tiefkühlschrank bei -25°C gelagert. Zur Auswertung der Kinetik wurden die Blätter dann bei Raumtemperatur getrocknet und wie oben beschrieben analysiert.

Der maximale Wert, somit der günstigste Erntetermin, ergab sich im Monat Juli mit einem Secologaningehalt von 2.5% bezogen auf das Trockengewicht der Blätter.

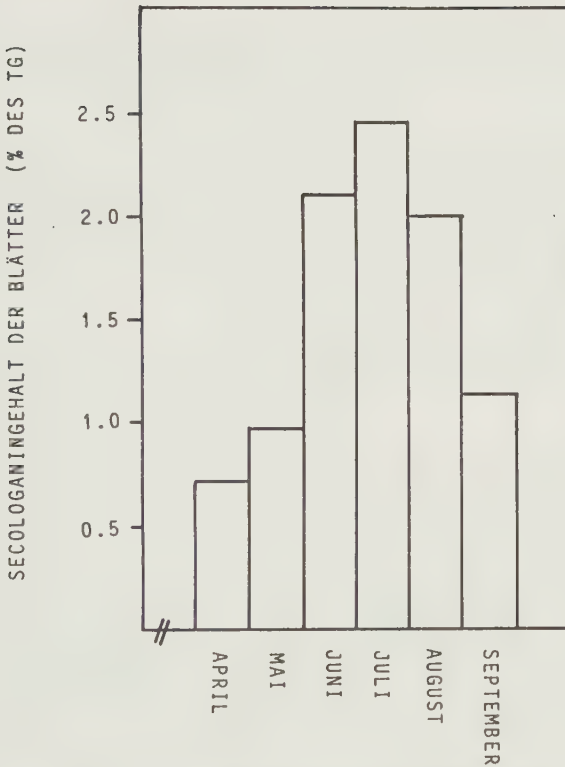


Abb.11 : HPLC-Bestimmung des Secologaningehaltes in Lonicera xylosteum L. Blättern im Verlauf einer Wachstumsperiode

Parallel zur HPLC-Bestimmung erfolgte die dünnschichtchromatographische Überprüfung der Extraktionsansätze. Hierbei wurden folgende R_f -Werte für Secologanin ermittelt:

Fließmittel FMS (siehe II 4.1)	R_f
1	0.45
6	0.35
8	0.26
11	0.40
12	0.55

Zum Ansprühen der DC-Platten wurde das von DICKINSON und JACOBSEN (1970) beschriebene Aldehyd-Sprühreagenz (siehe II 6.5.) eingesetzt.

1.1.2. Semipräparative Secologaninisolierung

Zur Secologaninisolierung im unteren mg-Bereich fand ebenfalls die HPLC Anwendung. Als Trennsäule kam in diesem Fall eine RP 8 Säule (Nucleosil, 7 µm) zum Einsatz.

Säulenabmessungen	1 x 25 cm
Flußrate	4 ml/min.
Fließmittel	MeOH/Wasser
Gradient	30 : 70 → 100 : 0 in 10 min
Detektion	250 nm
Probenaufgabemenge	bis 2.5 mg (bezogen auf Seco-
Retentionszeit Secologanin	5.5 min. loganin)

1.1.3. Präparative Secologaninisolierung

Obwohl die Hochdruckflüssigkeitschromatographie im Hinblick auf Trennschärfe und Reproduzierbarkeit sicherlich zu den bevorzugten Methoden zählt, wäre für eine HPLC-Isolierung von Secologanin im oberen Grammaßstab allenfalls eine präparative HPLC-Anlage geeignet. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch in den enormen Kosten vor allem für Lösungsmittel und Säulenmaterial.

Für die Auftrennung der polaren glycosidischen Komponenten aus Lonicera-Blättern bot sich eine günstige Alternative an: Die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie (siehe II 4.4), die sich in den letzten Jahren steigender Anwendung erfreut bei der Isolierung polarer Inhaltsstoffe (HOSTETTMANN et al. 1979).

Ausgangsmaterial der präparativen Secologanin-Isolierung waren, jeweils im Juli in der Umgebung von München gesammelte Blätter von Lonicera xylosteum L.. Die luftgetrockneten Blätter wurden mit einer Pulvermühle fein gemahlen. 500 g pulverisierter Blätter wurden dann mit 4 l MeOH bei Raum-

temperatur 48 Stunden gerührt. Nach anschließender Filtration (Faltenfilter) wurde das methanolische Filtrat am Rotationsverdampfer bei 40°C eingengt. Der ölige Rückstand wurde mit 400 ml Wasser aufgenommen und 4 mal mit 0.8 l Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Oberphasen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde nach SLEIGH (pers. Mitteilung) mit NaCl gesättigt und dann 4 mal mit 800 ml CHCl_3 /Ethanol (2:1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und ergab nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum 25 g Rohsecologanin (Reinheitsgrad: 35%, Ausbeute: 70% (bezogen auf die in den Blättern enthaltene Secologaninmenge)). Von diesem Rohsecologanin wurden insgesamt 750 g hergestellt.

Dieses Rohprodukt wurde anschließend mittels " Rotation Locular Countercurrent Chromatography " (RLCC) weiter aufgereinigt (siehe II.4.4.). Als günstigstes Zweiphasensystem für diese Flüssig-Flüssig-Chromatographie erwies sich CHCl_3 /MeOH / H_2O = 17 : 14 : 9. Die Substitution von CHCl_3 durch CH_2Cl_2 bzw. MeOH durch Ethanol ergab deutlich schlechtere Trennleistungen. Die Anlage wurde im absteigenden Modus betrieben, d.h. die organische Phase des Zweiphasensystems wurde als mobile Komponente verwendet.

4 g Rohsecologanin (siehe oben) wurden in 8 ml wässriger und 8 ml organischer Phase gelöst und auf die RLCC-Anlage gepumpt. Der Anstellwinkel (Neigungswinkel der Trennsäulen zur Bodenfläche) betrug 30°, die Umdrehungszahl 60 Upm, die Pumpgeschwindigkeit 1 ml/min. Der Verlauf der Elution konnte im UV bei 280 nm verfolgt werden. Es wurden Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen und die Secologanin-enthaltenen Eluate zu 3 Reinheitsgraden vereinigt.

		Ausbeute (%) Reinheitsgrad		
Vorfraktion	Nr. 94-103	100 mg	7	40%
Hauptfraktion	Nr. 104-128	745 mg	53	90%
Nachfraktion	Nr. 129-144	310 mg	22	70%

Die erhaltene Hauptfraktion (90%iges Secologanin) entsprach im Reinheitsgrad den Anforderungen für weitere Umsetzungen.

Im folgenden Blockdiagramm (Abb. 12) ist ein präparativer RLCC-Lauf bei 4 g Probenaufgabe (Rohsecologanin s.o.) dokumentiert.

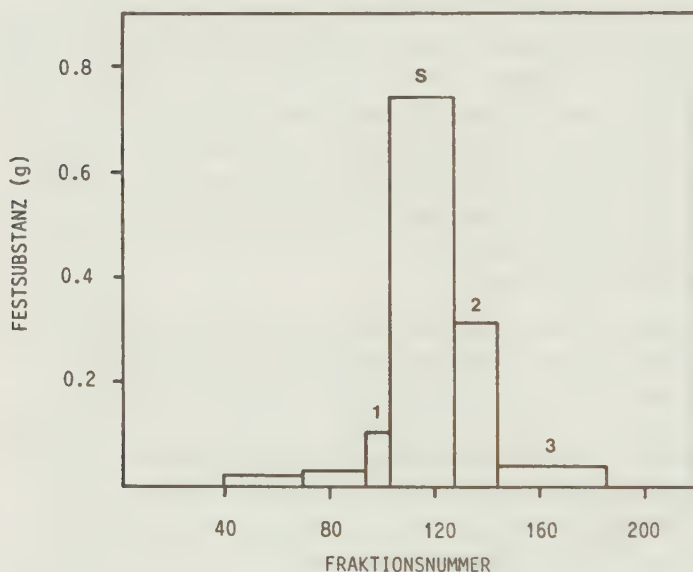
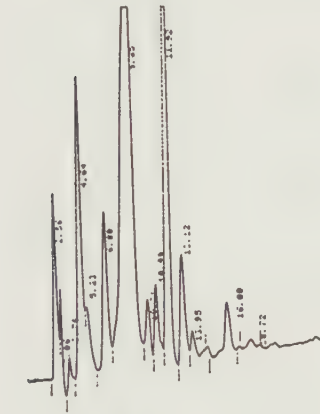


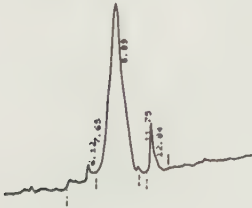
Abb.12 : RLCC-Blockdiagramm zur Auftrennung von 4 g Rohsecologanin (S=Secologanin, 1=Xylostosidin, 2=Swerosid, 3=Secologaninhalbacetal)

Aus der so erhaltenen Secologanin-Hauptfraktion kann durch Nachschalten eines Niederdruck-Säulenreinigungsschrittes (2.5 bar Säulendruck) chromatographisch reines Secologanin erhalten werden (99%). Dieses Reinigungsverfahren hat gegenüber der herkömmlichen (hydrostatischen) Säulenchromatographie den großen Vorteil der geringeren Verweilzeit der Proben auf der Säule. Dies ist natürlich in erster Linie bei reaktiven, d.h. also auch labilen Substanzen wie Secologanin relevant.

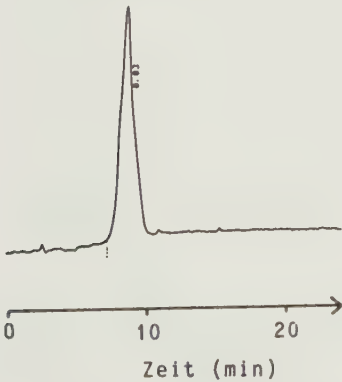
Aus 1 g RLCC Produkt wurde bei Verwendung einer 2.5 x 25 cm dimensionierten Säule bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/min 550 mg chromatographisch reines Secologanin erhalten



Rohsecologanin
(35 % rein)



RLCC-Produkt
(85 % rein)



Säulenendgerei-
nigtes Secologanin
(99 % rein)

Abb.13 : HPLC-chromatographische Reinheitsprüfung der isolierten Secologaninpräparationen

(Fließmittel 1). Die Reinheitsprüfung erfolgte mit HPLC (vgl. C 1.1.1.). Die relativ geringe Ausbeute dieses Verfahrens (61%) ist durch das hohe Adsorptionsvermögen des glucosidischen Secologanins am polaren Trägermaterial (Kieselgel) begründet (siehe Abb. 13).

Alternativ kann statt der RLCC-Apparatur eine andere Anlage eingesetzt werden, die auf der Tröpfchengegenstromverteilung beruht, also einem ganz ähnlichen Prinzip. Beim Arbeiten mit der DCCC (Droplet Current Counter Chromatograph) (siehe II.4.4.) war es aber, im Gegensatz zur RLCC, notwendig, das zu trennende Rohsecologanin mittels einer vorgeschalteten Kieselgelsäule, unter Inkaufnahme der oben geschilderten Nachteile, vorzureinigen.

Als Laufmittelsysteme dieser hydrostatischen Kieselgelvorbereitung sind Fließmittel Nr 1 oder 11 geeignet. Pro Säulengang (Säulenabmessungen: 25 x 6 cm, Flußrate: 1 ml/min) konnten 12.5 g Rohsecologanin chromatographiert werden und daraus 4 g (60%iges Secologanin) erhalten werden (Ausbeute 55%). 2.5 g dieses angereicherten Produkts wurden unter DCCC-Bedingungen (Flußrate 0.4 ml/min, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Wasser}$: 43 / 37 / 20, aufsteigende Betriebsart) gereinigt. Man erhielt 1.0 g Secologanin, das im Reinheitsgrad mit dem RLCC-Produkt vergleichbar war (Reinheit 89%).

Die vorherige Durchführung einer Säulenchromatographie war bei Aufgabe größerer Mengen auf die DCCC notwendig (bis 2.5g), andernfalls wurde das Zweiphasensystem empfindlich gestört, d.h. die für diese Trenntechnik erforderliche Tröpfchenbildung der mobilen in der stationären Phase war nicht mehr gewährleistet. Diese Schwierigkeiten treten bei Einsatz der RLCC nicht auf.

Dem in der folgenden Abbildung (Abb.14) angegebenen Trennschema zur Isolierung von 99%igem Secologanin ist somit der Vorzug zu geben.

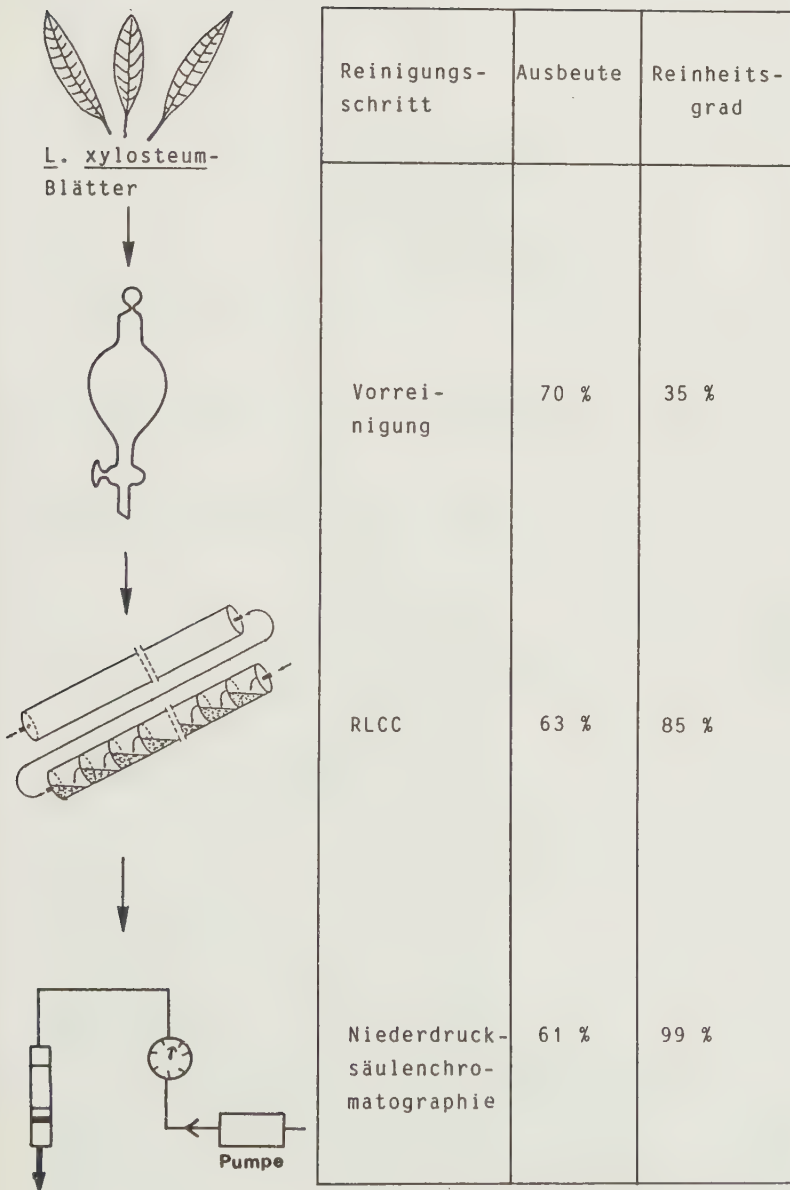
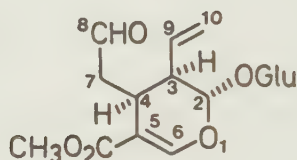


Abb.14 . Trennschema zur Isolierung von Secologanin im Gramm-Maßstab
(Die Ausbeuten beziehen sich auf den jeweiligen Reinigungsschritt)

1.2. Identifizierung der isolierten Glycoside

Secologanin



Für das isolierte Secologanin ergaben sich folgende spektroskopische Daten:

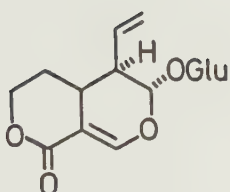
DCI-MS m/z (rel.Int.%): 389 ($M^+ + 1$, 29), 388 (7), 283 (5), 257 (9), 227 (100), 226 (56), 209 (31), 163 (55).

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (ϵ)	: 236 (3.90) nm
IR (KBr) cm^{-1}	: 3400, 2900, 1700, 1620, 1280, 1100.
$[\alpha]_D^{20}$	: -100^0 ($c = 0.9$) (Lit. -105^0).
$^1\text{H-NMR}$ (Pyridin- D_5)	: 9.9ppm (s) (1H, H-8), 7.7ppm (d, $J=2\text{Hz}$) (1H, H-6), 5.7ppm (m) (1H, H-9), 5.4ppm (d, $J=8\text{Hz}$) (1H, H-1'), 5.3ppm (d, $J=12\text{Hz}$) (1H, H-2), 5.1 - 5.2ppm (m) (2H, H-10), 4.5 - 4.6ppm (m) (2H, H-6'), 4.3 - 4.4ppm (m) (2H, H-3', H-4'), 4.2ppm (t, $J=8\text{Hz}$) (1H, H-2'), 4.1ppm (m) (1H, H-4), 3.8ppm (m) (1H, H-5'), 3.6ppm (s) (3H, O-CH ₃), 2.9 - 3.1ppm (m) (2H, H-7), 2.5ppm (m) (1H, H-3).

Alle erhaltenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit publizierten Literaturdaten (KINAST et al. 1976, BATTERSBY et al. 1970, EL-NAGGAR et al. 1980).

Neben Secologanin wurden als weitere glycosidische Komponenten identifiziert:

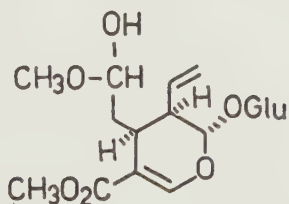
Swerosid



DCI-MS m/z (rel.Int.%): 359 ($M^+ +1,12$), 283 (6), 227 (15),
197 (65), 163 (100).

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (ϵ) : 246 (3.88) nm

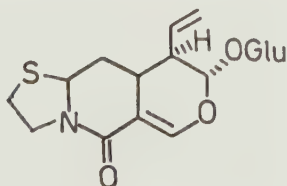
Secologaninhalbacetal



DCI-MS m/z (rel.Int.%): 421 ($M^+ +1,4$), 420 (2), 389 (2),
282 (8), 227 (100), 226 (71), 209
(17), 195 (79), 194 (75), 163 (12).

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (ϵ) : 235 nm

Xylostosidin



DCI-MS m/z (rel.Int.%): 416 (M^+ +1,12), 415 (6), 254 (26),
253 (24), 233 (24), 184 (100).

EI-MS m/z (rel.Int.%) der acetylierten Substanz:

583 (M^+ ,2), 541 (1), 410 (1), 331
(43), 271 (10), 239 (11), 169 (100).

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (ϵ) : 238 nm

Die Daten stimmen mit denen von Xylostosidin überein, einem schwefelhaltigen Iridoidglycosid, das erstmals 1980 von CHAUDHURI und STICHER (1980) aus L.xylostereum L. isoliert wurde.

2. Raucaffricinisolierung aus R.serpentina Zellsuspensionskulturen

Wie am Beispiel des Secologanins demonstriert, stellen trotz andauernder Fortschritte auf dem Gebiet der synthetischen Chemie Pflanzen immer noch exzellente Produzenten für strukturell komplizierte Substanzen dar. Der Zugang zu Naturstoffen aus Pflanzen ist jedoch oftmals mit Schwierigkeiten verbunden. Neben der Abhängigkeit von klimatischen und geographischen Gegebenheiten ist man in vielen Fällen auf den Import aus (sub)tropischen Ländern angewiesen. Eine feldmäßige Kultivierung von Pflanzen liefert erst nach mehreren Jahren Sekundärstoffe. Die Naturstoffgehalte angebauter Drogen unterliegen oft starken biologischen Schwankungen. In vielen Fällen sind die Inhaltsstoffe, so z.B. auch bei R.serpentina ungünstigerweise in der Wurzel lokalisiert. Die angesprochenen Nachteile der herkömmlichen Naturstoffgewinnung würden bei Einsatz von pflanzlichen Zellkulturen nicht auftreten.

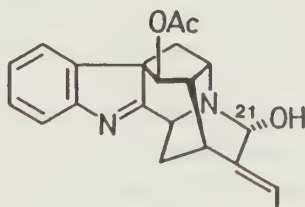
R.serpentina, in Indien und Pakistan beheimatet, wird seit Jahrhunderten volksmedizinisch angewandt (SEN et al. 1931). Die Bestimmung des Alkaloidmusters kultivierter Rauwolfia-Zellen ergab, daß alle Biosynthesesequenzen für typische Rauwolfia Alkaloide in der R.serpentina Zellkultur ausgeprägt waren (STÖCKIGT et al. 1981). In den folgenden Jahren wurden von PFITZNER und STÖCKIGT wesentliche Enzyme des

Ajmalan- Sarpaganbiosyntheseweges charakterisiert (PFITZNER und STÖCKIGT 1983, STÖCKIGT 1984).

In der vorliegenden Arbeit sollten nun pflanzliche Zellkulturen auch für die präparative Darstellung pharmazeutisch interessanter Indolalkaloide eingesetzt werden.

2.1 Revision der Raucaffricinstruktur

1962 wurde von TAYLOR et al. (1962) Vomilenin als ein neues Indolalkaloid aus Rauwolfia vomitoria Afz. beschrieben.



Vomilenin

Drei Jahre später isolierten KHAN et al. (1965) aus R.caffra Sond. eines der seltenen Indolalkaloidglycoside. Der Verbindung, Raucaffricin genannt, wurde die Struktur des Vomilenin 21 α -D-galactosids zugeordnet (KHAN et al. 1970).

Bei der Aufarbeitung gefriergetrockneter Zellen von R.serpen-
tina wurde im Gegensatz zu den Arbeiten von STÖCKIGT et al. (1981) und VOLLOSOVICH et al. (1979) auch die wasserlösliche Alkaloidfraktion untersucht. Es wurde ein Glycosid isoliert (FMS 1 R_f = 0.30, FMS 6 R_f = 0.38), das in allen physiko-chemischen Eigenschaften mit dem aus R.caffra beschriebenen Alkaloid identisch war. Das gleiche traf auch für eine Raucaffricinprobe zu, die von der Firma ROTH (Karlsruhe) bezogen wurde.

2.1.1. Physikochemische Eigenschaften von Raucaffricin, isoliert aus R.serpentina(L.) Bentham et Hook Zellsuspensionskulturen

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ)	: 258 (3.72), 220 (4.34) nm
$\lambda_{\min}$	: 240 (3.61) nm
IR (KBr)	: 3300, 2900, 1700, 1580, 1440 cm^{-1}
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	: +14.5° (EtOH, c=0.4) (Lit.:+14.5°).
EI-MS m/z (rel.Int.%)	: 351 (42), 291 (10), 273 (16), 183 (30), 170 (21), 169 (100), 168 (51), 167 (25), 156 (29), 107 (18), 106 (19).
DCI-MS (Isobutan)	: 513 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 569 ($[\text{M}+\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 12).
Elementaranalyse	: C (62,59%), H (6.27%), N (5.34%).
CI-MS (des acetylierten Produkts:	681 ($[\text{M}^++\text{H}]^+$, 52)

Exakt übereinstimmende Daten wurden auch für Raucaffricin von ROTH erhalten. Damit besteht kein Zweifel, daß die Substanzen identisch sind.

2.1.2. Chemische Hydrolyse von Raucaffricin

Zur Identifizierung der Zuckerkomponente wurden 10 mg Raucaffricin (19.5 μMol) mit 1,5 ml Trifluoressigsäure 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen erfolgte die Neutralisierung der Reaktionsmischung mit 2 N NaOH bzw. NaHCO_3 . Der abgespaltene Zuckeranteil konnte mit zwei verschiedenen Nachweismethoden identifiziert werden.

A: Dünnschichtchromatographische Zuckeridentifizierung

Ein Aliquot der wässrigen Lösung wurde nach der Hydrolyse in FMS 4 ($R_f=0.45$) und FMS 5 ($R_f=0.31$) chromatographiert (zum Vergleich FMS 4: R_f Glucose: 0.45, R_f Galactose: 0.25). Dieses zunächst überraschende Ergebnis, wonach der abgespaltene Zucker Glucose ist, wurde durch enzymatische Tests bestätigt.

B: Enzymatische Detektion der Zuckerkomponente

Zu 200 μl der oben erhaltenen Hydrolysemischung wurden

2.5 ml Triethanolaminpuffer (0.3 M, pH 7.5, mit 4mM MgSO_4), 100 μl NADP^+ (0.4 mM), 100 μl ATP (0.5mM) gegeben und die Absorption bei 340 nm gemessen. (Die Molaritätsangaben entsprechen jeweils den Konzentrationen im Testvolumen). Nach Zugabe von je 20 nkat Hexokinase (E C 2.7.1.1.) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (E C 1.1.1.49) zeigte die Bildung von NADPH eindeutig die Gegenwart von Glucose an.

Als Kontrollreaktion wurde mit dem gleichen Ausgangsprodukt ein enzymatischer Test auf das Vorhandensein von Galactose durchgeführt. 200 μl der Hydrolysemischung wurden mit 2 ml KPi-Puffer (50mM, pH 8.6, mit 4mM MgSO_4) und 200 μl NAD^+ (0.7 mM) versetzt. Nach Zugabe von 8 nkat Galactosedehydrogenase (E C 1.1.1.48) resultierte keine Veränderung der Absorption bei 340 nm. Damit ist zweifelsfrei die Anwesenheit von Galactose ausgeschlossen.

2.1.3. Enzymatische Raucaffricinspaltung

Chemische Spaltungsmethoden ermöglichten stets nur eine unvollständige Freisetzung des Zuckeranteils aus Raucaffricin. Bei Inkubation von 2 mg Raucaffricin (3.9 μMol) in 2 ml KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0) mit 1 mg *R. serpentina* Proteinrohextrakt (0.3 nkat/mg) war nach 1 Std. bei 30°C das Glycoalkaloid vollständig in das Aglycon überführt. Der abgespaltene Zucker wurde, wie unter 2.1.2. beschrieben, als Glucose identifiziert.

2.1.4. NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Raucaffricinstruktur

Die 1965 postulierte Summenformel des Glucoalkaloids Raucaffricin wurde als $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{N}_2$ angegeben (KHAN et al. 1965) und 1970 berichtigt zu $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{N}_2$ (KHAN et al. 1970). Basierend auf ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Struktur eines Vomilenin α -galactosids erst kürzlich erneut bestätigt (KHAN et al. 1982).

Die im folgenden beschriebene Strukturaufklärung des Raucaffricins bediente sich neuer NMR-spektroskopischer Methoden wie homo- und heteronuclear korrelierter Meßtechniken (vgl. II 5.2.). Als günstigste Reihenfolge der Meßverfahren wurden zunächst die Protonenresonanzen im (eindimensionalen) $1D-^1H$ -Spektrum ermittelt. Das anschließende $2D-COSY$ -Experiment ermöglichte die Zuordnung der entsprechenden Kopplungspartner. Nach Aufnahme des ^{13}C -Spektrums waren Aussagen über Anzahl und Art vorhandener C-Atome zu treffen. Mit der heteronuclear korrelierten Aufnahmetechnik ($^1H-^{13}C$ -HETCOR-Spektrum) konnte die Übereinstimmung der Protonen- als auch der ^{13}C -Spektreninterpretation erfolgen.

Abb. 15 zeigt das $1D-^1H$ -NMR-Spektrum von Raucaffricin in deuteriertem Pyridin. Die drei scharfen Resonanzlinien bei 8.7, 7.5 und 7.1 ppm sind dem Pyridin zuzuordnen. Infolge der Hygroskopizität des Lösungsmittels erscheint bei 6 ppm ein deutliches Wassersignal. Die aromatischen Protonen sind im Bereich von 7.2 - 7.8 ppm klar voneinander getrennt. Das Dublett bei 1.4 ppm (H-18) sowie das Quartett (H-19) bei 5.8 ppm können aufgrund der gemeinsamen Kopplung ($J=6.5$ Hz) nur aus der Ethylidengruppierung stammen. Literaturdaten entsprechend kann H-3 im Bereich von 3.5 - 5 ppm vermutet werden (LOUNASMAA et al. 1985), die Resonanzlagen der Methylenprotonen H-6 und H-14 dagegen bei höherem Feld (bei ca. 2 -3 ppm).

Zur eindeutigen Zuordnung der Protonensignale bediente man sich früher ausschließlich Doppelresonanzexperimenten. Durch Einstrahlung der Resonanzfrequenz eines Signals kann die Spin-Spin-Kopplung mit anderen Kernen eliminiert werden. Dieses führt zu einer Aufhebung der Signalaufspaltung. Damit sind Kopplungspartner sowie die entsprechenden Kopplungs-

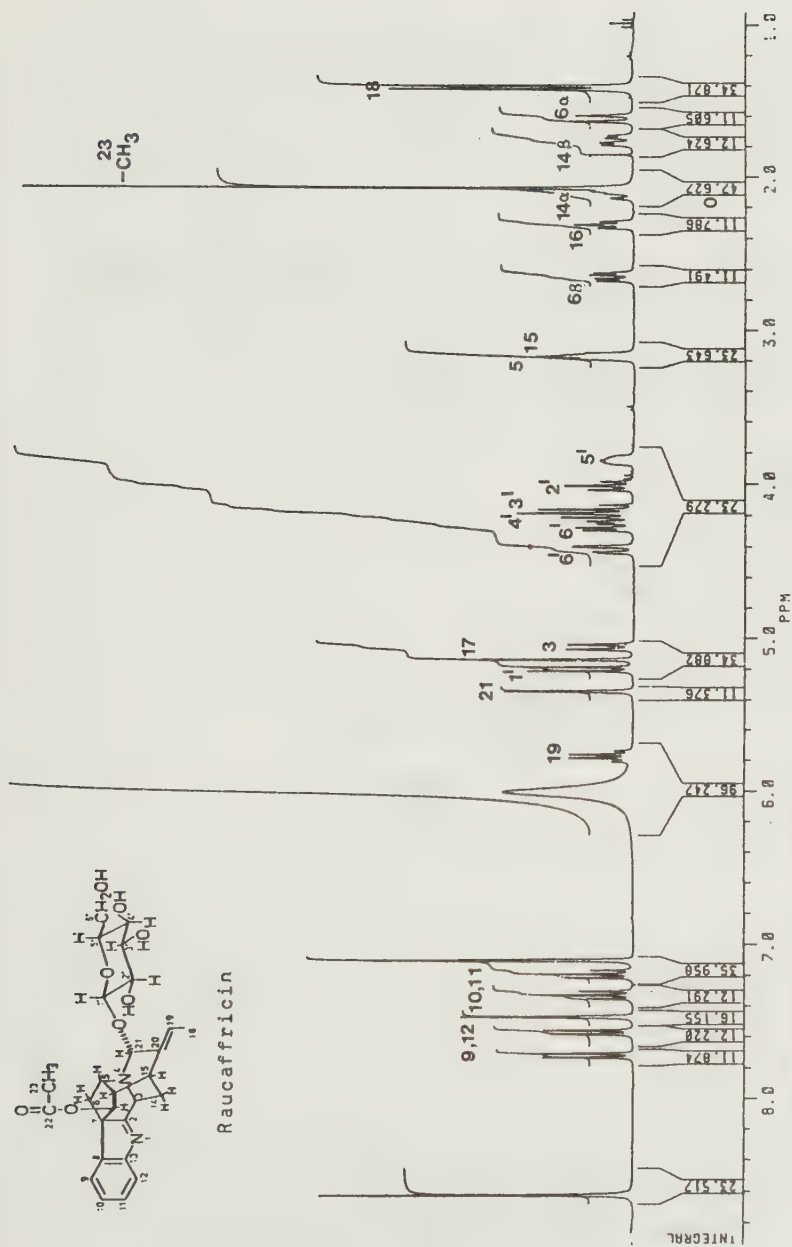
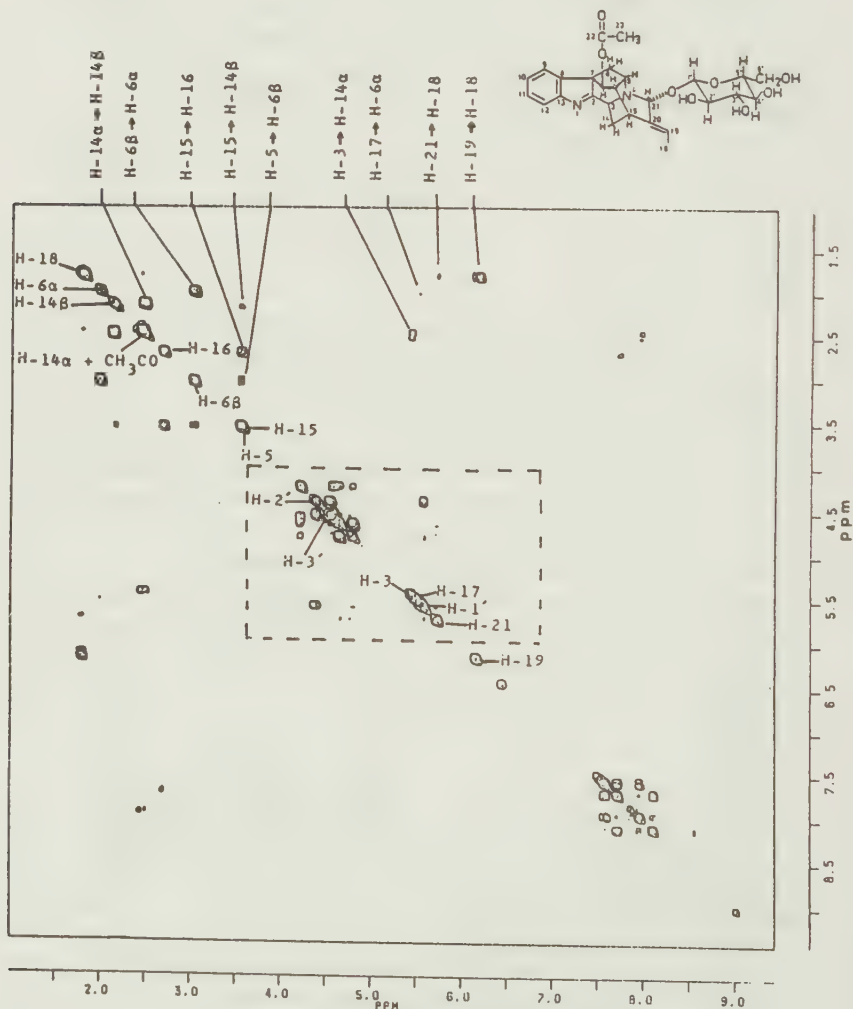


Abb. 15 : 1D-¹H-NMR-Spektrum von Raucaffricin (in Pyridin-D₅, 300 MHz)

konstanten bestimmbar. Im zweidimensionalen COSY-Experiment (COSY= correlated spectroscopy) sind die jeweiligen Kopplungspartner direkt aus der zweidimensionalen Darstellung des Spektrums zu entnehmen. Abb. 16 zeigt die 2D-Darstellung als Konturdiagramm (vgl. hierzu II.5.2.).



Im Bereich der Tieffeldprotonen zwischen 5 und 6 ppm sind 3 deutliche Kopplungspaare erkennbar: H-19 $\rightarrow$ H-18, H-21 $\rightarrow$ H-18 und H-3 $\rightarrow$ H-14 α . Die letztgenannte Kopplung wird durch einen Diederwinkel von 30 $^{\circ}$ zwischen H-3 und H-14 α erklärbar. H-14 β dagegen koppelt nicht mit H-3 infolge des Diederwinkels von ca. 100 $^{\circ}$. H-14 β zeigt eine Kopplung mit einem Proton des Multipletts bei 3.2 ppm, also H-15. H-15 weist keine Allylkopplung mit H-19 auf (Diederwinkel 175 $^{\circ}$), wohl aber eine Kopplung mit H-16. H-16 und H-17 bilden einen Diederwinkel von ca. 100 $^{\circ}$, damit ist keine Kopplung feststellbar. Schließlich verbleiben noch 3 zuzuordnende Signale des Aglycons im

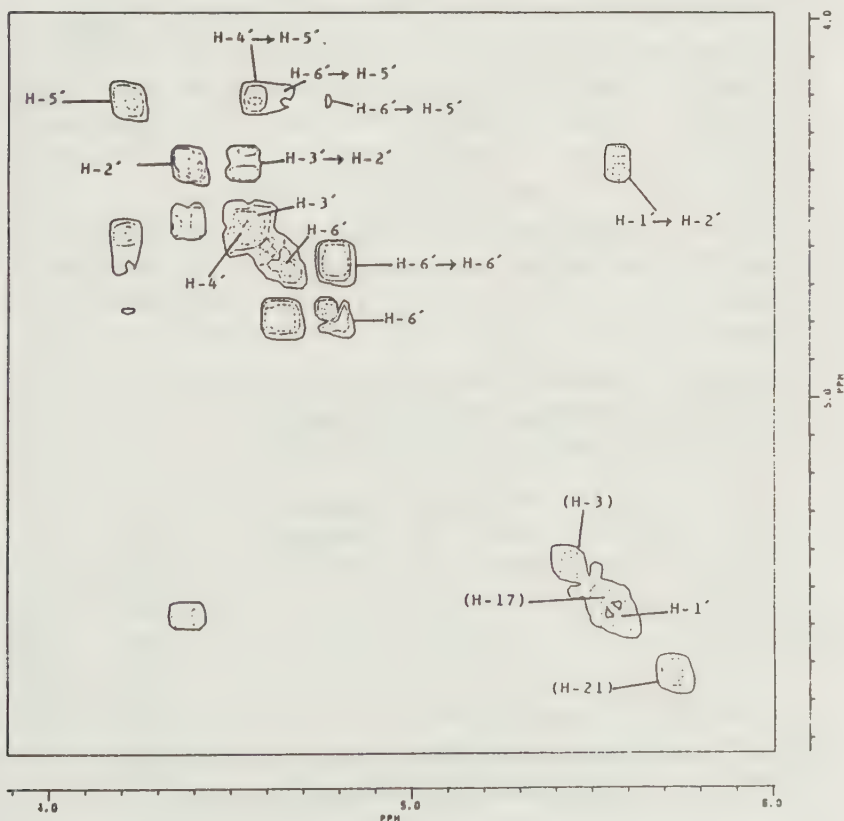


Abb.17 : Ausschnittsvergrößerung des COSY-Spektrums von Abb.16 für die Zuordnung der Zuckerprotonen

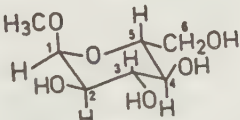
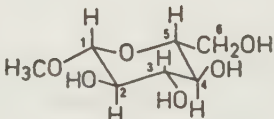
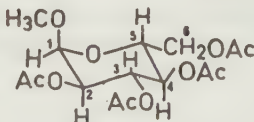
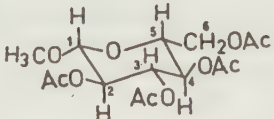
Hochfeldbereich H-5, H-6 α und H-6 β . Die Resonanzlinie von H5 wird von H-15 überdeckt, zeigt aber dennoch eine Kopplung mit H-6 β . Bei H-6 β ist eine geminale Aufspaltung mit H-6 α zu verzeichnen. H-6 α koppelt darüber hinaus mit H-17 (W-Anordnung, vgl. GÜNTHER 1983). Somit sind alle Signale des Aglycon-Teils zugeordnet. Das monomere H-1' des Zuckeranteils liegt in Übereinstimmung mit Literaturdaten bei 5.29 ppm (BARUAH *et al.* 1983). Aus dem eindimensionalen Spektrum konnte für H-1' eine Kopplungskonstante von 8 Hz registriert werden. Dieser Wert spricht eindeutig für eine β -glycosidische Verknüpfung. Für die Zuordnung der verbleibenden Zuckerprotonen sei auf die Ausschnittsvergrößerung (Abb. 17) verwiesen. H-1' kann nur mit H-2' (bei 4.1 ppm) koppeln. H-2' ermöglicht die Zuordnung von H-3'. H-4' zeigt eine Aufspaltung durch H-5', dem kompliziertesten Signal im Protonenspektrum (bei 3.9ppm). Weiterhin ist eine Kopplung von H-5' mit H-6' zu erkennen. Die Ergebnisse der Protonenresonanzspektren sprechen demnach eindeutig für eine β -glycosidische Bindung.

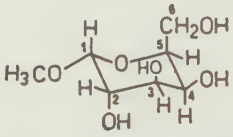
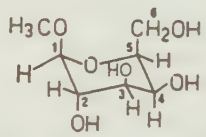
Dieser Befund wurde zusätzlich durch eine ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchung geklärt. Tab.2 faßt die ^{13}C -Daten der Zucker C-Atome von Raucaffricin in verschiedenen Lösungsmitteln zusammen.

C-Atom	Pyridin	DMSO	DMF
1'	102.2	98.1	99.1
2'	75.6	73.9	73.9
3'	78.7	76.9	76.9
4'	71.6	70.3	70.3
5'	78.7	76.9	76.9
6'	62.8	61.3	61.4

Tab.2 : ^{13}C -NMR Signalzuordnungen der Zucker-C-Atome von Raucaffricin in verschiedenen Lösungsmitteln (in ppm)

Zum Vergleich sind in Tab.3 die ^{13}C -Verschiebungen von in DMSO vermessenen Zuckerderivaten (in ppm) angegeben.

A GLUCOPYRANOSIDERIVATE			
 1-O-CH₃ α-D-glucosid  1-O-CH₃ β-D-glucosid			
C-Atom-Nr.	ppm	ppm	
1	99.8	104.3	
2	72.3	73.9	
3	73.7	77.1	
4	70.7	70.6	
5	72.9	77.1	
6	61.3	61.6	
-OCH ₃	54.7	56.6	
 Tetraacetyl-1-OCH₃ α-D-gluc.  Tetraacetyl-1-OCH₃ β-D-gluc.			
C-Atom-Nr.	ppm	ppm	
1	95.9	100.1	
2	68.1	70.5	
3	69.9	72.1	
4	66.7	68.2	
5	69.3	70.8	
6	61.6	61.6	
-OCH ₃	54.7	50.1	

B GALACTOPYRANOSEDERIVATE		
 1-O-CH₃ α-D-galactosid  1-O-CH₃ β-D-galactosid		
C-Atom-Nr.	ppm	ppm
1	100.5	104.8
2	69.0	71.0
3	70.2	73.8
4	69.4	68.7
5	71.5	75.5
6	61.3	61.0
-OCH ₃	55.0	56.4

Tab.3 : ^{13}C -Resonanzlinien verschiedener Zuckerderivate (DMSO- D_6 , 200 MHz)

A : Glucopyranosederivate

B : Galactopyranosederivate

Die Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten (PFEFFER et al. 1979).

Abb. 18A zeigt das breitbandentkoppelte (BB)- ^{13}C -NMR-Spektrum von Raucaffricin in deuteriertem Pyridin. Von 27 zu erwartenden Kohlenstoffsignalen sind 26 getrennt. Abb. 18B und Abb. 18C stellen das Ergebnis einer durchgeführten DEPT-Serie dar (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). Diese ermöglicht eine selektive Erfassung primärer, sekundärer, tertiärer und quartärer C-Atome. In Abb. 18B ergeben CH_2 -Gruppen jeweils negative, CH_3 - und CH -Gruppierungen positive Signale. Die nach Subtraktion vom BB-entkoppelten Spektrum verbleibenden Signale sind somit quartären C-Atomen zuzuordnen. In Abb. 18C erscheinen nur CH -Gruppen als Signale. Die Zuordnung der Methylgruppen (C-18, C-23) gelingt problemlos, ebenso können die 3 vorhandenen CH_2 -

Gruppen nach steigenden ppm Werten entsprechend den Literaturdaten als C-14, C-6 und C-6' identifiziert werden (DANIELI et al. 1981).

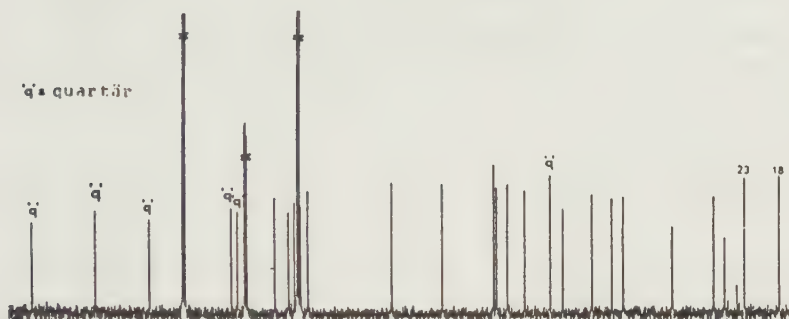


Abb.18 A : Breitbandenkoppeltes ^{13}C -Spektrum von Raucaffricin in Pyridin- D_5 (300 MHz)

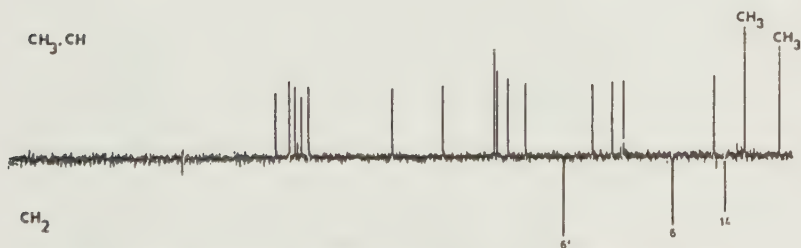


Abb.18 B : DEPT-Spektrum von Raucaffricin (CH , CH_3 -positiv; CH_2 -negativ)

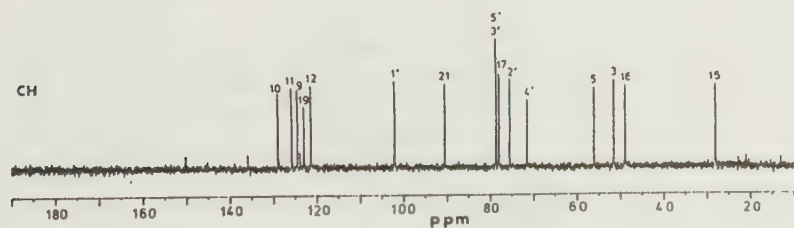


Abb.18 C : DEPT-Spektrum von Raucaffricin (CH -selektiv)

Abb. 19 gibt das 2D- ^1H - ^{13}C -HETCOR-Spektrum von Raucaffricin wieder. Auf der Abszisse sind die Signalverschiebungen der Protonen, auf der Ordinate die ^{13}C -ppm Werte aufgetragen.

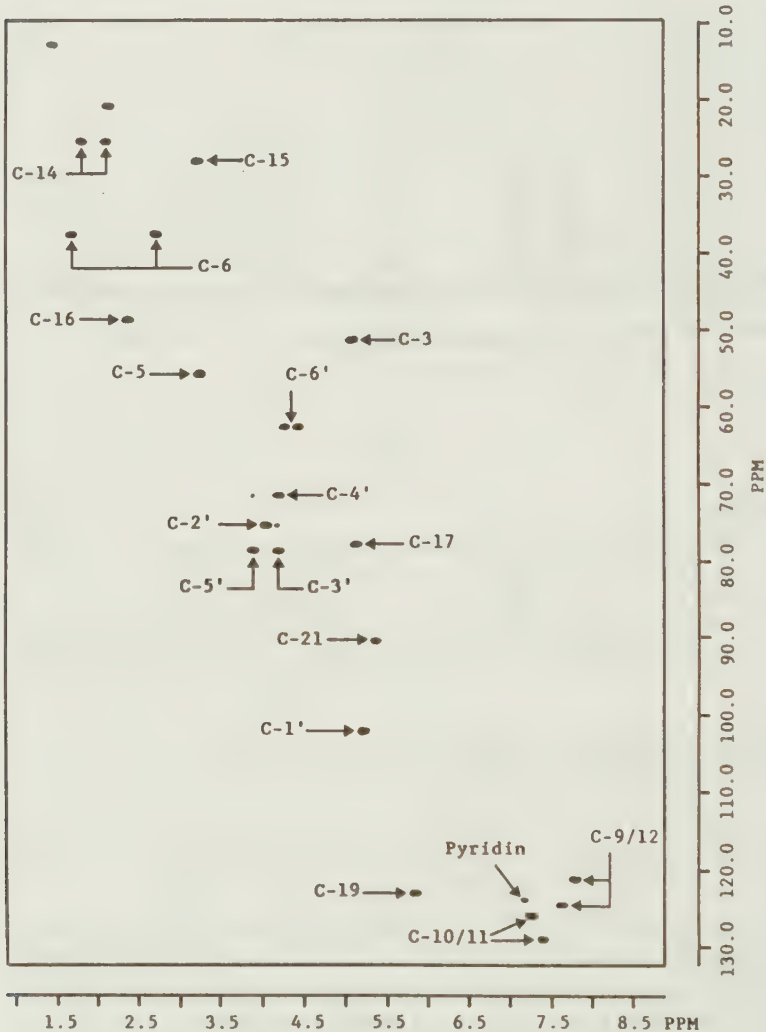


Abb. 19 : 2D- ^1H - ^{13}C -HETCOR-Spektrum von Raucaffricin

Pyridin- D_5 (300 MHz)

Mit dieser Aufnahmetechnik konnten sowohl die ^{13}C -Resonanzlagen als auch die Protonenzuordnungen bestätigt werden.

Zur endgültigen Klärung, ob eine α -(wie bisher behauptet)- oder eine β -glycosidische Bindung der Glucose im Raucaffricin vorliegt, wurde die C-1'-H-1' Kopplungskonstante herangezogen. Für die acetylierten Glucosederivate (vgl. 2.1.4.A.) ergaben sich folgende Werte:

	C-1'-H-1' Kopplung [Hz]
β -glycosidische Verknüpfung	162,5 160,1
α -glycosidische Verknüpfung	174,1 173,6

Im direkten Vergleich wurde für Raucaffricintetraacetat bei 2 Messungen 158 bzw. 161 Hz ermittelt. Eine Kopplungskonstante dieser Größe entspricht Literaturangaben für β -glycosidische Bindungen (HALL et al. 1980). Diese Daten stehen im Einklang mit einer β -glycosidischen Verknüpfung im Raucaffricin. Der sogenannte NOE (Nuclear Overhauser Effect) wird häufig als ein wichtiges Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung von Naturstoffen eingesetzt (NOULS et al. 1968, LIBOT et al. 1980); insbesondere wenn die räumliche Nähe von Gruppierungen innerhalb eines Moleküls zu beweisen ist (siehe auch II.5.2). Im Fall des Raucaffricins ergab das Dreiding-Modell, daß sich H-5 und H-21 sowie H-15 und CH_3 -18 räumlich sehr nahe stehen (in Abb.20 mit Pfeilen symbolisiert).

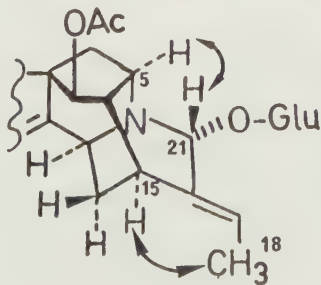


Abb.20 : Zu erwartende NOE-Effekte im Raucaffricin zwischen H-5 und H-21 sowie H-15 und CH_3 -18

Die Richtigkeit der in Abb. 21 dargestellten Struktur mußte daher durch ein NOE-Experiment abgesichert werden. Das COSY-Experiment (Abb. 6A) von Acetylraucaffricin (siehe II.5.2) in CDCl_3 bestätigt die Signalzuordnung für Raucaffricin. Die Probe wurde entsprechend II.5.2 entgast. Sauerstoffabwesenheit mußte gewährleistet sein, da ausschließlich intra-molekulare Effekte gemessen werden sollten (vgl. GÜNTHER S. 283, 1983). Intermolekulare Dipol-Dipol-Relaxation durch O_2 war deshalb zu vermeiden. In 10 nacheinander durchgeführten Experimenten ergab sich bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz der Methylgruppe (CH_3 -18) eine durchschnittliche Intensitätssteigerung von H-15 von 10%. Als interner Standard wurden die bei der Einstrahlung nicht veränderten Aromatenintegrale herangezogen. Das erhaltene Ergebnis bestätigt die in Abb. 20 angegebene Struktur, denn nur bei der trans-konfigurierten Ethyliden-Seitenkette kann sich ein meßbarer NOE-Effekt zwischen CH_3 -18 und H-15 ergeben. Einstrahlungsexperimente bei H-21 ergaben bei Beobachtung von H-5 einen geringeren, aber deutlich meßbaren Effekt von 6% als Durchschnittswert von 8 Messungen. Übereinstimmende Ergebnisse resultierten bei Aufnahme des NOE-Differenzspektrums von Raucaffricin in Pyridin- D_5 . Damit ist sowohl die trans-Konfiguration der Ethylidengruppierung abgesichert als auch die β -Stellung von H-21 untermauert. Anstelle der bisher angenommenen Struktur eines Vomilenin α -D-galactosid ist Raucaffricin identisch mit einem Vomilenin β -D-glucosid.

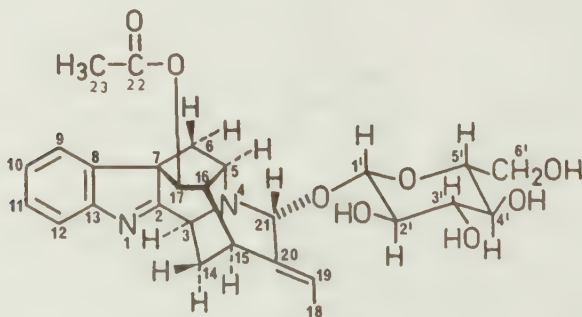


Abb.21 : Raucaffricin (SCHÜBEL, TREIBER und STÖCKIGT (1984))

2.2. Rauwolfia serpentina Zellsuspensionskulturen als ertragreichste Quelle für Raucaffricin

2.2.1. Vorkommen von Raucaffricin in Zellkulturen und in differenzierten Pflanzen

In der Vergangenheit waren als einzige Raucaffricinquelle die Wurzeln von Rauwolfia caffra Sond. Pflanzen bekannt (KHAN et al. 1965). Als maximaler Wert wurden von HABIB und COURT (1974) 0.245 % Raucaffricin bestimmt, bezogen auf das Trockengewicht der abgeschälten Wurzelrinde. Für die effektive Raucaffricinisolierung schieden R.caffra Wurzeln jedoch aus mehreren Gründen aus. Zum einen ist die Pflanze in Südafrika und Sambia beheimatet, zum anderen stellt das Vorkommen eines Naturstoffes in Wurzeln große Probleme dar hinsichtlich der Aufarbeitung sowie der Nachlieferung von Pflanzenausgangsmaterial. Es wurden deshalb verschiedene Zellkulturen auf das Vorkommen dieses seltenen Indolglucosids getestet. Neben R.serpentina Benth. konnte auch in Kulturen von R.caffra Sond., R.mannii Stapf. sowie R.verticillata Chevalier Raucaffricin detektiert werden.

Nach 18-tägiger Wachstumszeit im LS-Medium (LINSMAIER und SKOOG 1965) wurden je 100 g Zellmaterial gefriergetrocknet und mit 200 ml MeOH extrahiert. Mit HPLC wurde anschließend quantitativ der Alkaloidgehalt bestimmt (Tab.4). Folgendes Trennsystem kam zum Einsatz:

Säule	: Hibar LiChroCart, MERCK (0.4 x 25 cm)
Säulenmaterial	: RP 18 (7µm)
Fließmittel	: Acetonitril/Wasser 10mM(NH ₄) ₂ CO ₃
Gradient	: 20 : 80 → 60: 40 in 30 min.
Flußrate	: 1 ml/min.
Detektion	: 280 nm
Probenvolumen	: 20 µl
Retentionszeit von Raucaffricin	: 13.0 min.

	g Raucaffri- cin/l Medium	g TG/l Medium	% Raucaffri- cin des TG
<u>R. caffra</u> Sond.	0.053	30	0.18
<u>R. mannii</u> Stapf.	0.013	17	0.08
<u>R. vertici- llata</u> Chevalier	0.022	13	0.17
<u>R. serpen- tina</u> Benth.	0.390	20	1.95

Tab.4 : Raucaffricingehalt verschiedener Rauwolfia-Zellsuspensions-
kulturen (in LS-Medium)

R. serpentina Zellkulturen zeigen damit schon bei Einsatz eines Standardmediums (LS) einen um den Faktor 7.9 höheren Raucaffricingehalt als die R. caffra Pflanze.

2.2.2. Steigerung der zellulären Raucaffricinproduktion in R. serpentina Zellsuspensionskulturen

Pflanzliche Zellkulturen sind in der Lage in modifizierten Nährmedien Sekundärstoffkonzentrationen zu erzielen, die die der Pflanzen weit übertreffen (vgl. ZENK 1982). Auf der Basis des Alkaloid-Produktions (AP)-Mediums nach ZENK et al. (1977) wurde versucht, die Raucaffricinbildung in R. serpentina Zellkulturen zu steigern. Die Bestimmung des Alkaloidgehalts erfolgte über HPLC (vgl. 2.2.2.). Abb. 22 illustriert den Verlauf der Raucaffricinbildung bei Variationen der Kohlenhydratquelle im Nährmedium.

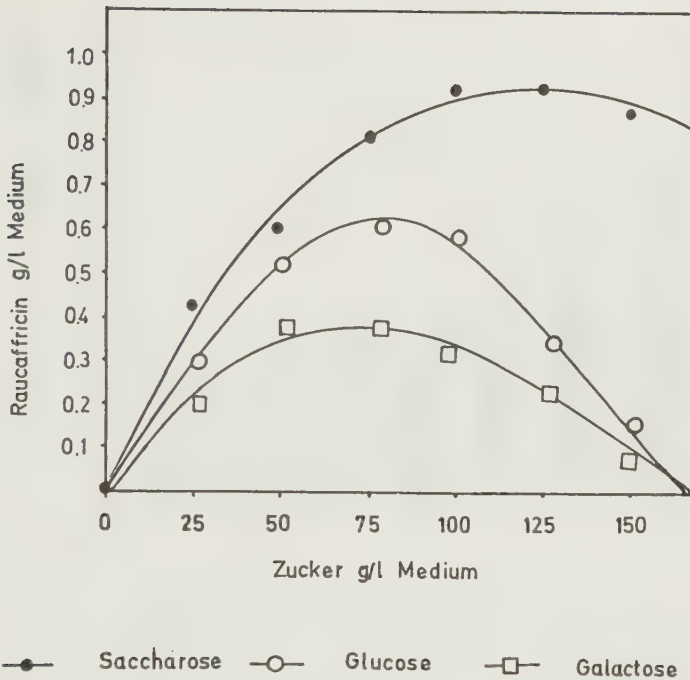


Abb.22 : Abhängigkeit der zellulären Raucaffricinbildung in R. serpentina von der Kohlenhydratquelle im Nährmedium

Von den 3 eingesetzten Zuckern vermag Saccharose bei einer Konzentration von 100 g/l Medium am effektivsten die zelluläre Raucaffricinproduktion zu erhöhen. Unter diesen Bedingungen werden 0.94 g Raucaffricin/l Nährlösung gebildet. Im Vergleich zu den mit Galactose und Glucose erzielten Maximalwerten von 0.38 g/l bzw. 0.6 g Raucaffricin/l ergibt Saccharose eine Steigerung von 147% bzw. 57%.

Ausgehend von diesem in Bezug auf den Kohlenhydratgehalt optimierten Produktionsmedium wurde der Einfluß anderer Medienbestandteile untersucht. In den in Abb. 23 angegebenen Konzentrationsbereichen wurden myo-Inosit, L-Tryptophan, NZ-Amine und $MgSO_4$ dem Medium zugesetzt.

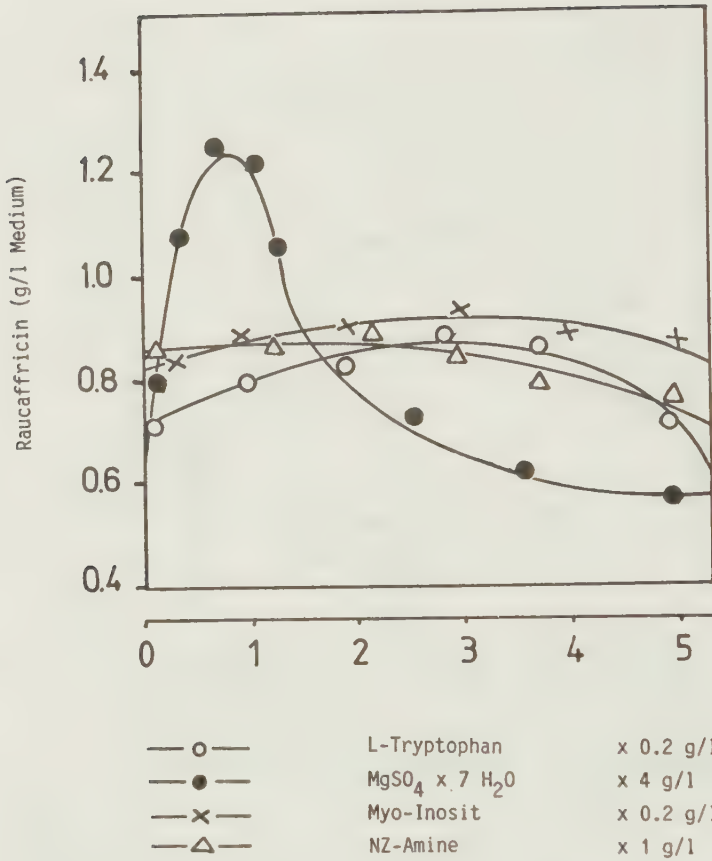


Abb.23 : Einfluß verschiedener Medienbestandteile auf den Raucaffricingehalt

Bei 2.5 g MgSO₄ pro Liter Nährlösung konnte die Raucaffricinbildung auf einen Wert von 1,2 g Alkaloid/l Medium weiter gesteigert werden. Im Blockdiagramm (Abb.24) sind die erzielten Raucaffricingehalte in R.serpentina Zellen bei Einsatz verschiedener Nährmedien zusammengefaßt.

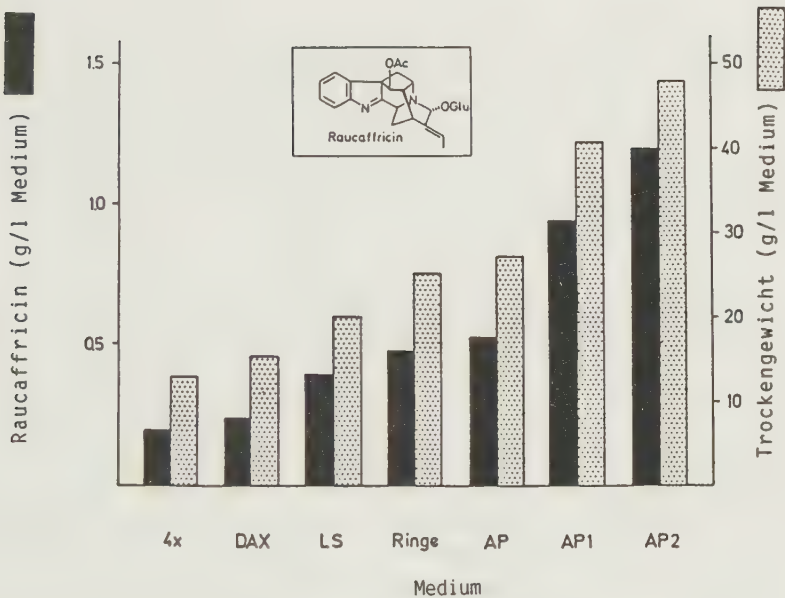


Abb.24 : Optimierung der Raucaffricinproduktion in R.serpentina-Zellsuspensionskulturen durch Medienvariation

Als Vergleich sind die erzielten Ausbeuten mit R.caffra Zellkulturen bei Einsatz der gleichen Nährlösung aufgeführt (AP-Medium mit 100 g Saccharose und 2.5 g $MgSO_4/l$):

	Raucaffricin g/l	TG g/l	Raucaffricin % d.TG
<u>R.caffra</u> Sond.	0.25	38	0.66
<u>R.serpentina</u> Benth.	1.2	48	2.5

Beide Zellkulturen übertreffen damit den bisherigen Höchstwert von 0.25% Alkaloidgehalt aus R.caffra Wurzeln. Für eine präparative Raucaffricinproduktion wurden im folgenden ausschließlich R.serpentina Zellkulturen eingesetzt.

2.3. Präparative Raucaffricinisolierung durch Rotation Locular Countercurrent Chromatography (RLCC)

Auch für die Isolierung des hydrophilen Indoleninglucosids Raucaffricin bietet sich aufgrund schon beschriebener Vorteile (siehe I 4.4.) die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie als Trennmethode der Wahl an.

Als Ausgangsmaterial wurden 30 kg Rauwolfia serpentina Pflanzengewebe (Wachstumsdauer in AP-Medium : 18 Tage) gefriergetrocknet. Nach dem Wasserentzug verblieben 2.55 kg (8.5%) eines trockenen, feinen Zellpulvers. 10 g dieses Lyophilisierungsproduktes wurden mit 200 ml MeOH 2 mal 24 Std. unter Rühren extrahiert. Nach dem Abfiltrieren und Einrotieren entsteht ein Rückstand von 4.1 g, d.h. 41% des getrockneten Zellmaterials sind in MeOH löslich. 4.6% dieses extrahierten Substanzgemisches stellen das gewünschte Raucaffricin dar. Andere Alkaloide, z.B. Vomilenin, ergaben zusammen ca. 10-20% dieser Menge. 95% des Methanolextraktes sind Verunreinigungen, v.a. Zuckeranteile. Dieses Rohprodukt war von hoher Konsistenz, deshalb ungeeignet für eine weitere flüssig-flüssig chromatographische Aufreinigung. Als wesentlich günstigeres Extraktionsmittel erwies sich der organische Anteil eines Zweiphasengemisches mit der Zusammensetzung $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$: 43-37-20. Bei Substitution von MeOH durch die Unterphase dieses Gemisches erhält man als Extraktionsprodukt nur noch 1.58 g (15.8%). Die im MeOH-Auszug unerwünschten Verunreinigungen konnten somit auf ca. ein Drittel verringert werden. Die isolierte Raucaffricinmenge war in beiden Fällen gleich (1.9% des TG).

Dieses Extraktionsverfahren wurde deshalb für die Aufarbeitung von 2.55 kg R. serpentina Zell-Lyophilisat verwendet. Nach 24-stündigem Rühren mit 50 l der organischen Phase des beschriebenen Zweiphasensystems ergaben sich 380 g Extraktionsprodukt (14.9%). 24 g dieser Ausgangssubstanz wurden in 30 ml des Zweiphasengemisches (Verhältnis organische:wässrige Phase 1:1) gelöst und jeweils in einem RLCC-Lauf aufgereinigt. Die RLCC-Bedingungen zur Raucaffricinisolierung wurden wie folgt gewählt:

Flußrate	70 ml/Std.
Umdrehungszahl	80 Upm
Anstellwinkel	35°
Fraktionsgröße	10 ml
Betriebsart	absteigend
mobile Phase	organ. Anteil von CHCl_3 -MeOH- H_2O : 43-37-20
stationäre Phase	wässriger Anteil von CHCl_3 -MeOH- H_2O : 43-37-20

Es wurden 60 Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen Nr. 30-50 wurden vereinigt und einrotiert. Den Rückstand löste man in 3 ml MeOH und nach Zugabe von 100 ml H_2O wurde 3 mal mit je 50 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Nach dem Waschen der organischen Phase mit 2 mal 50 ml H_2O wurden die vereinigten wässrigen Phasen gefriergetrocknet. Hierbei wurden 2.5 g Raucaffricin erhalten (Reinheitsgrad 90-95%). Mit 16 reproduzierbaren RLCC-Läufen konnten auf diese Art 40 g Raucaffricin isoliert werden. Die Betriebsdauer pro Lauf ergibt sich zu insgesamt 16 Std. (1 Std. Probenaufgabe, 8 Std. Durchfluß der mobilen Phase, 7 Std. Spülen der Anlage mit stationärer Phase). Im Hinblick auf eine evtl. im größeren Maßstab durchzuführende Anwendung dieser Trenntechnik ist erwähnenswert, daß die im Rohgemisch enthaltenen Zucker ebenfalls präparativ über RLCC getrennt werden können. Hierzu wird nach 16 Std. absteigender Elutionsart einfach der Betriebsmodus gewechselt. Die bei der Chromatographie mit organischer Phase (vgl. (A) in Abb. 25) auf der Apparatur verbliebenen hydrophilen Zucker werden hierbei im aufsteigenden Modus mit der wässrigen mobilen Phase eluiert (siehe (B) in Abb. 25). Nach dieser Methode kann ein Großteil der eingesetzten Saccharose zurückgewonnen werden.

3. Strictosidin-Akkumulation in R.serpentina Zellsuspensionskulturen

3.1. Optimierung der zellulären Strictosidinanreicherung in R.serpentina Zellkulturen

Als weiteres Beispiel eines im Gramm-Maßstab zellulär synthe-

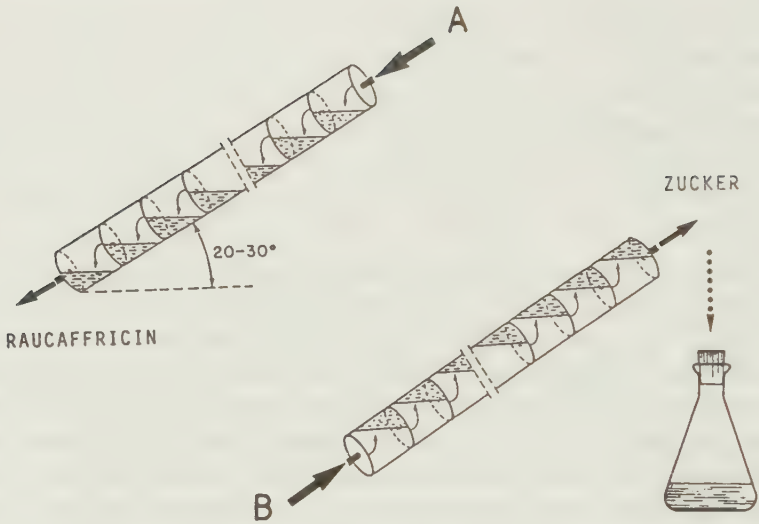
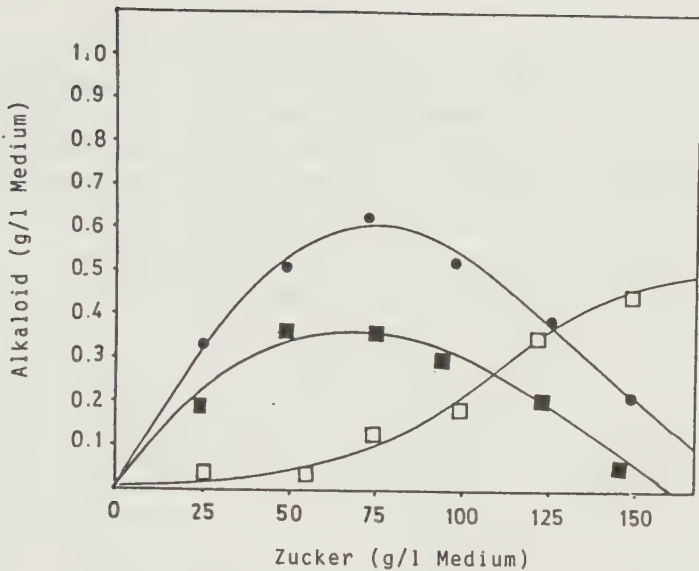


Abb.25 : Einsatzmöglichkeit der Rotation Locular Countercurrent Chromatography (RLCC) zur Raucaffricinisolierung (A) und anschließender Zuckerrückgewinnung (B)

tisierbaren Naturstoffes wurde versucht, das Indolalkaloid-intermediat Strictosidin mit Hilfe von *R.serpentina* Zellkulturen zu produzieren. Bei den durchgeführten Medienmodifikationen konnte zunächst kein Strictosidin durch HPLC- bzw. DC-Analyse in den Pflanzenzellen nachgewiesen werden.

Wie Abb. 22 verdeutlicht, steigt der Raucaffricingehalt bei vermehrtem Saccharoseangebot im Medium deutlich an und verbleibt bei optimaler Zuckermenge (100-120 g Saccharose/l) auf einem Maximalwert. Verändert man hingegen die Glucosemenge, so ergeben sich signifikante Unterschiede: Die Raucaffricinproduktion erreicht bei 75 g Glucose/l ein Maximum und nimmt dann deutlich bei weiterer Erhöhung der Glucosekonzentration ab (Abb. 26A).



Raucaffricingehalt bei Variation der Glucose- (●-) und Galactosekonzentration (■-).

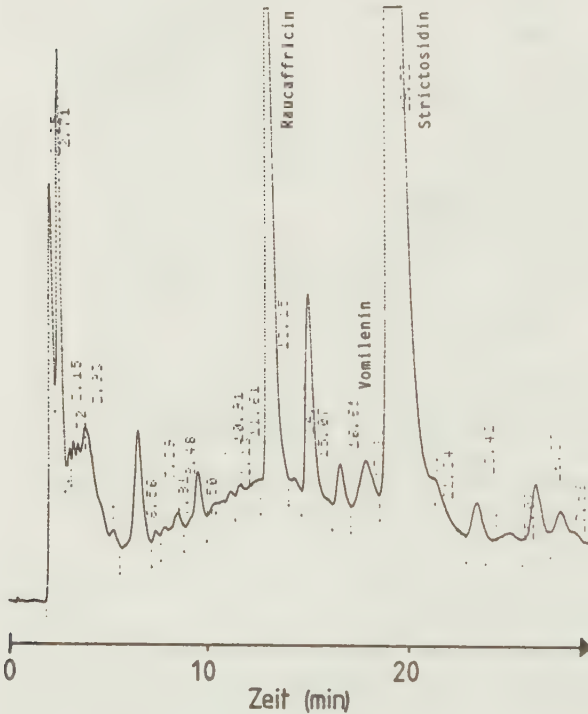
Strictosidingehalt bei Veränderung der Glucosekonzentration (-□-).

Abb.26 A : Einfluß der Glucose- bzw. Galactosekonzentration im Medium auf die Bildung der Alkaloidglucoside Strictosidin und Raucaffricin

Der gleiche Effekt, jedoch deutlich geringer ausgeprägt, war bei Zusatz von Galactose zu verzeichnen. Interessanterweise ist hierbei eine Verringerung des zellulären Raucaffricingehalts verbunden mit einer Erhöhung der Strictosidinakkumulation. Die HPLC-chromatographische Auswertung ergab als Maximalwert 0.5 g Strictosidin und 0.15 g Raucaffricin pro Liter Medium.

Die in Abb. 26B aufgeführten Werte für die Strictosidinbildung in *R.serpentina* wurden mit einem modifizierten AP-Medium (ZENK et al. 1977) erzielt. Statt 50 g Saccharose wurden 170 g Glucose pro Liter Nährlösung eingesetzt. Die Wachstumsdauer der Zellen betrug 18 Tage in 1 l Erlenmeyerkolben mit

je 250 ml Medium. Bei zu spätem Animpfen oder einer länger als 18tägigen Wachstumszeit sank der Strictosidingehalt deutlich ab. Die Raucaffricinmenge stieg entsprechend an. Im Kapitel in vivo NMR (siehe Anhang) sind deshalb Versuche unternommen worden, in intakten Pflanzenzellen Veränderungen



Elutionsbedingungen:

Säule	:	Hibar LiChroCart, MERCK (0.4x25cm)
Säulenmaterial	:	RP 18 (7µm)
Fließmittel	:	Acetonitril/ 10mM (NH ₄) ₂ CO ₃
Gradient	:	20 : 80 → 60 : 40 in 30 min.
Flußrate	:	1 ml/min.
Detektion	:	280 nm
Retentionszeiten	:	13.1 min. (Raucaffricin)
		17.6 min. (Vomilenin)
		19.3 min. (Strictosidin)

Abb. 26 B : HPLC-Diagramm eines methanolischen Alkaloid-extraktes aus R.serpentina

der stofflichen Zusammensetzung NMR-spektroskopisch zu erfassen.

3.2. In vitro Hemmversuche der Strictosidin β -D-glucosidase(n)
Durch Fütterungsexperimente mit [5- 13 C]Strictosidin (vgl. Anhang) konnte der Einbau in Raucaffricin bewiesen werden. Das Iridoidglucosid Secologanin wird enzymatisch in Strictosidin, dieses wiederum in Raucaffricin transformiert (Abb.27).

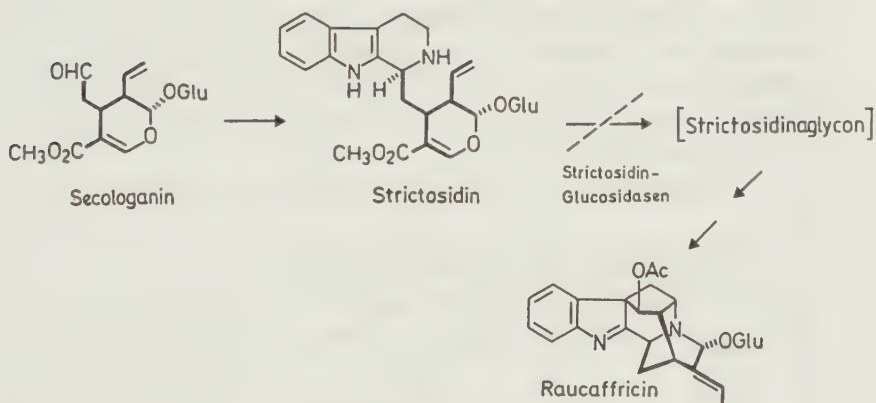


Abb.27 : Akkumulation von Strictosidin durch Hemmung der spezifischen Strictosidinglucosidasen

Die in 3.1 beschriebenen Medienabwandlungen wiesen auf eine mögliche in vivo Hemmung der von HEMSCHIEDT *et al.* (1980) beschriebenen spezifischen Strictosidin β -D-glucosidasen hin. Diese Vermutung der Möglichkeit eines Stoffwechselblocks durch Enzyminhibition mußte durch in vitro Experimente bewiesen werden. Hierzu wurde Strictosidin mit steigenden Zuckermengen und Proteinextrakt aus R.serpentina wie folgt inkubiert: 50 μ l einer Strictosidinlösung (5 mg/ml) wurden mit je 50 μ l R.serpentina Enzymmischung (7 mg Protein/ml) sowie steigenden Zuckermengen versetzt. Im Gesamtvolumen von 0.5 ml wurde die Zuckerkonzentration von 0-5 molar variiert. Nach 45-minütiger Reaktionsdauer bei 30°C wurden 100 μ l der Inkubationsmischung

entnommen und das Protein durch Zusatz von 300 μ l MeOH denaturiert. Nach Zentrifugation wurden die Tests wie oben beschrieben mit HPLC ausgewertet. Gemessen wurde die durch die Strictosidin β -D-glucosidasen katalysierte Abnahme der Strictosidinkonzentration.

Abb. 28 zeigt, da β bei 4 molarer Glucosekonzentration eine 50 %ige Hemmung der Strictosidinglucosidasen zu verzeichnen ist. Der registrierte Effekt f $\ddot{u}$ r Glucose ist deutlich st $\ddot{a}$ rker als bei Fructose oder dem Zuckeralkohol Mannit. Das Resultat best $\ddot{a}$ tigt auf enzymatischer Ebene die beobachtete Strictosidinakkumulation, die unter *in vivo* Bedingungen bei hoher Glucosekonzentration auftritt. Damit er $\ddot{o}$ ffnet sich die M $\ddot{o}$ glichkeit eines pr $\ddot{a}$ parativen Zugangs dieses wichtigen Intermediats im Alkaloidstoffwechsel.

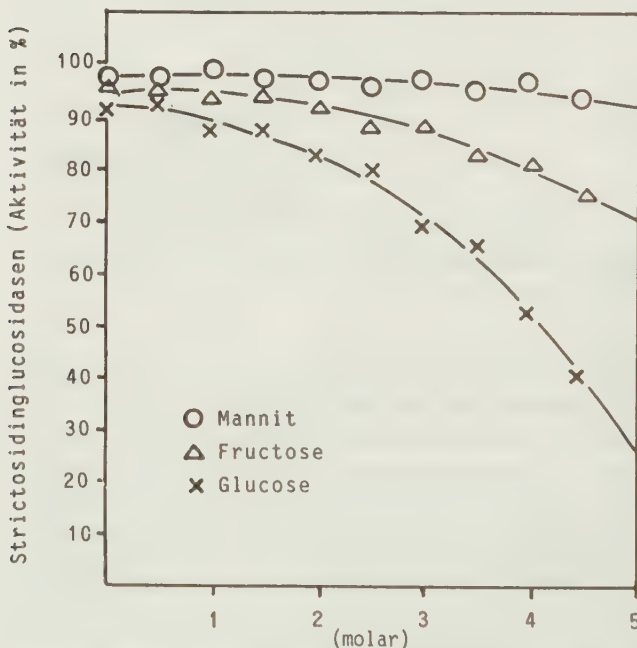


Abb.28 : Hemmung des enzymatisch katalysierten Abbaus von Strictosidin in Anwesenheit verschiedener Zucker

3.3. Präparative Trennung von Strictosidin und Raucaffricin mit RLCC

Zur präparativen Trennung von Strictosidin und Raucaffricin kann ebenfalls die RLCC eingesetzt werden. Als Ausgangsmaterial dient ein methanolischer Rohextrakt aus Strictosidinproduzierenden R.serpentina Zellen. Die HPLC-Analyse ergab einen Gehalt an Raucaffricin von 520 mg sowie 280 mg Strictosidin. Hierfür waren 48 g Zelltrockengewicht bzw. 1 l Medium notwendig. In dem für die Raucaffricinisolierung verwendeten Zweiphasensystem (siehe 2.3.) wurde zunächst mit der organischen Phase das in der Mischung enthaltene Raucaffricin eluiert (Ausbeute 420 mg; 81%). Nach 35 Std. wurde die Laufrichtung geändert. Mit der wässrigen mobilen Phase konnte nun das Strictosidin erhalten werden (Ausbeute 220 mg; 78%).

Der Vergleich von UV, DC, HPLC-Daten sowie die Massenspektren der Acetylierungsprodukte bestätigen die Identität des Strictosidins.

B. Enzymatische Intermediatsynthese

Die im Rahmen dieser Arbeit bislang beschriebenen Verfahren beschränkten sich auf die Bereitstellung und Produktionssteigerung zellulär gebildeter Intermediate. Ein enormer Vorteil beim Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen besteht darin, daß erstmals auch größere Mengen an Enzymen des Sekundärstoffwechsels zugänglich werden. Wie in der Einleitung erwähnt, konnte deshalb im letzten Jahrzehnt eine Reihe komplizierter Biosyntheseabläufe im Pflanzenreich aufgeklärt werden. Darüber hinaus eröffnet der gezielte präparative Einsatz pflanzlicher Enzyme neue Synthesemöglichkeiten.

1. Präparative enzymatische Strictosidindarstellung mit immobilisierter Strictosidinsynthese

Nach einer im Arbeitskreis ZENK von U.PFITZNER ausgearbeiteten Methode wurde das zellulär gebildete Secologanin zellfrei in Strictosidin überführt (U.PFITZNER und ZENK 1982). Die Isolierung der hierzu notwendigen Strictosidinsynthese erfolgte aus Catharanthus roseus G.Don Zellkulturen. Die erhaltenen Enzympräparationen wurden durch Gelchromatographie von den biosynthetischen Folgeenzymen, Strictosidinglucosidase a und b befreit. Nach der Immobilisierung der Strictosidinsynthese an CNBr-aktivierter Sepharose blieben 30% der katalytischen Aktivität erhalten. Mit dem trägerfixierten Enzym wurden nach dem unten skizzierten Verfahren 10 g Strictosidin synthetisiert.

Das enzymatisch gewonnene Strictosidin wies folgende spektroskopische Daten auf:

UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) : 289, 280, 272, 225 nm
IR (KBr) : 3400, 2900, 1690, 1630 cm^{-1}

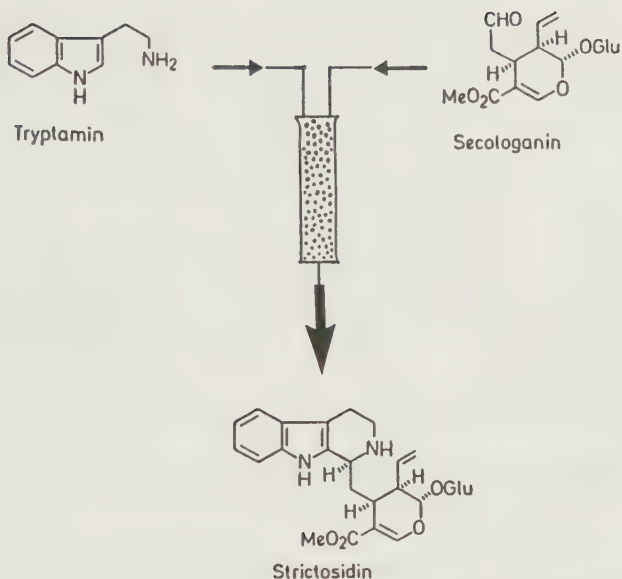


Abb.29 : Zellfreie Strictosidinsynthese mit immobilisierter Strictosidinsynthase, nach U. PFITZNER und ZENK (1982)

Durchfluß : 10 ml/h
 Enzymaktivität : 80 nkat
 Glassäule : 1x8 cm

Ferner wurde Strictosidin zu seinem Acetylierungsprodukt (Pentaacetylstrictosidin) derivatisiert (siehe II 6.2.). Die MS-Daten stimmten mit jenen von STÖCKIGT (1979) und U. PFITZNER und ZENK (1982) überein.

Ebenso waren die spektroskopischen Daten des nach BATTERSBY et al. (1969) synthetisierten Strictosidinlactams mit Literaturwerten identisch.

Wie zu erwarten, fehlt im ^1H -NMR Spektrum des Strictosidins, gemessen in Pyridin- D_5 , das Aldehydproton des Secologanins bei 9.9ppm (vgl. A 1.2.). Statt dessen ist die NH-Resonanzlinie des Tryptaminanteils bei 12.3ppm zu erkennen (vgl. Abb. 30).

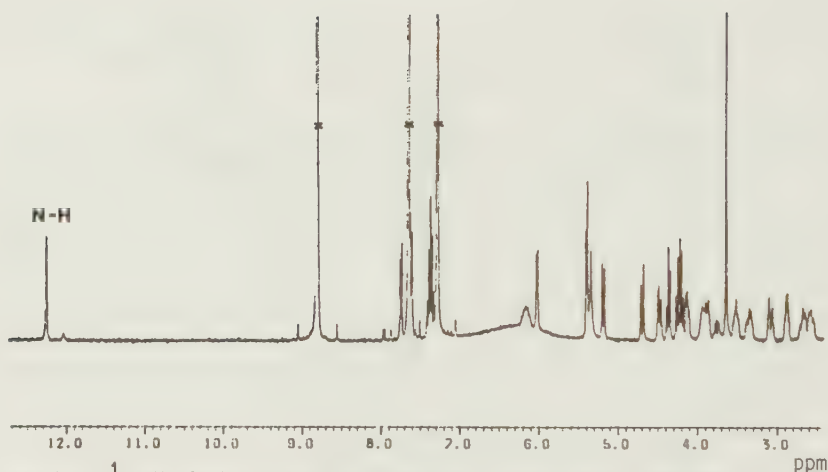


Abb.30 : ^1H -NMR-Spektrum von Strictosidin in Pyridin- D_5 (360 MHz)

Der Einsatz trägerfixierter Strictosidinsynthase ermöglicht die präparative Synthese von stereochemisch reinem 3- α -S-Strictosidin. Dieses Verfahren ist sowohl Isolierungsverfahren (0.01% Strictosidin aus *Rhazya stricta* Decaisne, SMITH 1968) als auch chemischen Synthesen (BATTERSBY *et al.* 1968) hinsichtlich seiner Effektivität eindeutig vorzuziehen.

2. Enzymatische Synthese von Vomilenin aus Raucaffricin

2.1. Zellfreier Umsatz von Raucaffricin zu Vomilenin

Neben Strictosidin stellt das reaktive Vomilenin ebenfalls ein interessantes Alkaloid für biomimetische Synthesen dar. Ausgehend von Raucaffricin wurde deshalb versucht, mit HCl , H_2SO_4 und CF_3COOH das Aglycon Vomilenin zu erhalten. Bei Variation der Reaktionsparameter Säurestärke, Temperatur und Reaktionszeit gelang es in keinem der durchgeführten Experimente, Vomilenin nachzuweisen. Auch konnte auf chemischem Wege keine quantitative Abspaltung des Glucoserestes von Raucaffricin erreicht werden. Wie nachfolgende Untersuchungen zeigen werden (vgl. 4.1.), lagert sich unter diesen Bedingungen das Raucaffricin in ein stabiles Sarpaganglucosid um. Somit ist die Bildung von Vomilenin durch H^+ -katalysierte

Abspaltung der Glucose von Raucaffricin offensichtlich nicht möglich.

Auch der Einsatz 8 kommerziell erhältlicher Glycosidasen erlaubte keine effektive Freisetzung des Aglycons. Im einzelnen wurden folgende Enzyme getestet:

	<u>Herkunft</u>	<u>Lieferquelle</u>
1. β -Glucosidase	Mandeln	SIGMA
2. β -Glucosidase	Mandeln	ROTH
3. α -Glucosidase	Hefe	SIGMA
4. β -Galactosidase	<u>E.Coli</u>	BOEHRINGER
5. β -Galactosidase	<u>Aspergillus niger</u>	SIGMA
6. β -Galactosidase	<u>E.Coli</u>	SIGMA
7. α -Galactosidase	Kaffeebohnen	SIGMA
8. α -Galactosidase	<u>Aspergillus niger</u>	SIGMA

Von jedem der aufgeführten Enzyme wurden 1 U (16.7 nkat) mit je 2 mg Raucaffricin (3.9 μ mol) bei 30°C in 2 ml 0.1M KPi-Puffer (pH 6.0) inkubiert. Die Reaktionsdauer betrug 8 Tage bei fortwährender HPLC-Überprüfung der Raucaffricinabnahme bzw. der Zunahme des Aglycons Vomilenin. Lediglich die β -Galactosidase aus Aspergillus niger vermochte eine geringe Raucaffricinspaltung zu katalysieren (spezifische Aktivität: 0.3 pkat/mg Enzym). Diese für präparatives Arbeiten völlig ungenügenden Umsätze resultierten wahrscheinlich aus Verunreinigungen des als Galactosidase deklarierten Enzymgemisches der Firma SIGMA. Erst durch Zuhilfenahme eines Proteinextraktes aus R.serpentina gelang es schließlich, Raucaffricin quantitativ in sein Aglycon (Vomilenin) und Glucose zu spalten. Hierzu wurde nach Standardmethoden eine Proteinisolierung durchgeführt (siehe II 9.). Die Bestimmung nach BRADFORD (1976) ergab eine Proteinmenge von 4 mg/ml. In einem Gesamtvolumen von 1 ml (0.1 M KPi-Puffer, pH 6.0) wurden 250 μ g Raucaffricin (0.49 nMol) mit steigender Menge des R.serpentina Proteinrohextraktes versetzt. Nach 30-minütiger Reaktion bei 30°C erfolgte die HPLC-chromatographische Auswertung.

In Abb. 31 ist die Proteinabhängigkeit, damit also der Beweis der enzymatischen Umwandlung des Glucoalkaloids zu Vomilenin dargestellt.

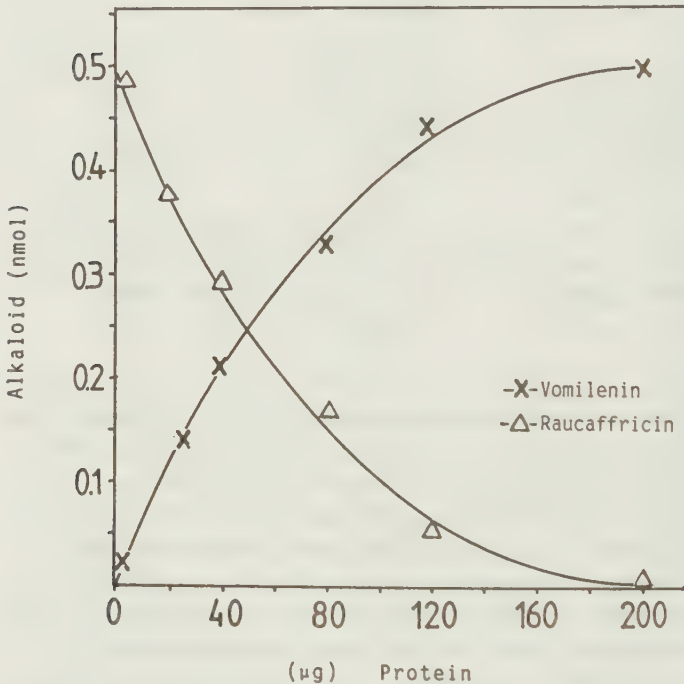


Abb.31 : Proteinabhängiger Umsatz von Raucaffricin zu Vomilenin

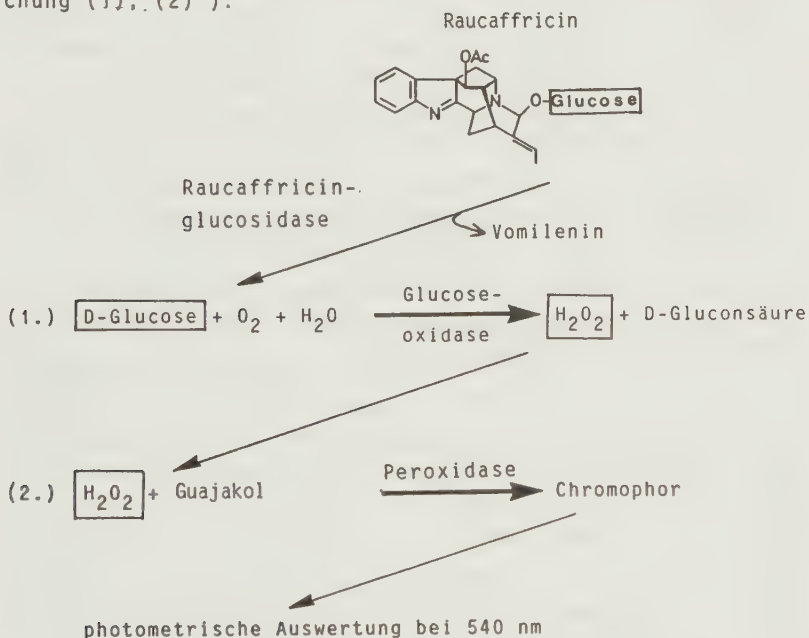
2.2. Enzymtests für die Raucaffricin β -D-glucosidase

Die enzymatische Hydrolyse von Raucaffricin kann mittels zweier verschiedener Testsysteme verfolgt werden.

- Die Detektion der abgespaltenen Glucose mit Hilfsenzymen und anschließender photometrischer Messung.
- Durch HPLC-Quantifizierung der Raucaffricinab- bzw. der Vomileninzunahme.

2.2.1. Raucaffricin β -D-glucosidase Test durch enzymatischen Nachweis der abgespaltenen Glucose

Bei der enzymatischen Hydrolyse von Raucaffricin wird pro Mol gespaltenem Glucoalkaloid ein Mol Glucose freigesetzt. Aus der Menge des gebildeten Zuckers kann somit auf die Aktivität der Raucaffricinglucosidase geschlossen werden. Verwendet wurde das Prinzip des Glucosidase/Peroxidase Tests, der sich auch in verschiedenen Abwandlungen in der medizinischen Diagnostik bewährt hat (CLARK und SWITZER 1977). Diesem gekoppelten optischen Test liegt folgendes Meßprinzip zugrunde (Gleichung (1), (2)):



Wie aus Gleichung (1) ersichtlich, benötigt die Reaktion Sauerstoff; folglich stört auch die Anwesenheit reduzierender Agenzien wie z.B. β -Mercaptoethanol.

Der standardmäßig durchgeführte Testansatz enthielt:

50 µl Raucaffricin	(750 µg bzw. 1,5µMol/50µl)
50 µl Glucoseoxidase	(16,7 nkat)
50 µl Peroxidase	(667 nkat)
50 µl Guajakol	(1:20 verdünnt mit EtOH)

Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe der auf Raucaffricin β -D-glucosidase zu testenden Enzympräparation gestartet (Gesamtvolumen 1 ml, 0.1 M KPi-Puffer, pH 6.0, 30°C). Die Zuckerfreisetzung konnte visuell verfolgt werden aufgrund eines roten Farbstoffes, der durch Oxidation aus Guajakol entstand. Eine Quantifizierung erfolgte durch photometrische Messung bei 540 nm. Benzidinblau konnte nicht als Chromophor verwendet werden, da R.serpentina Proteinextrakte den Farbstoff entfärben. Infolge der beteiligten Glucoseoxidasereaktion (siehe Gleichung 1) besitzt das gewählte Testsystem eine hohe Selektivität. Es ermöglicht eine schnelle Prüfung auf Raucaffricin β -D-glucosidase in beliebigen Enzympräparationen. Als Nachweisgrenze wurden 5 pkat pro Testansatz ermittelt.

2.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatischer (HPLC)-Test auf Raucaffricin β -D-glucosidase

Mit einem zweiten (HPLC)-Testsystem ergibt sich als Ergänzung die Möglichkeit, sowohl das zu spaltende Glucosid als auch sein Aglycon quantitativ zu erfassen. Die Notwendigkeit der Enzymaktivitätsbestimmung, unabhängig von der gebildeten Glucosemenge, ergab sich beispielsweise bei Experimenten zur Inhibierung der Enzymreaktion.

Der Enzymtest wurde standardmäßig bei 1mM Raucaffricinkonzentration im Ansatzvolumen von 1 ml durchgeführt (0.1 M KPi-Puffer; pH 6.0). Nach beendeter Inkubation wurden 100 µl des wässrigen Ansatzes entnommen und mit 300 µl MeOH versetzt. Nach kurzem Schütteln (Whirlymix) konnte das denaturierte Protein durch Zentrifugation abgetrennt und der klare Überstand HPLC-chromatographisch untersucht werden. Die Nachweisgrenze im Testansatz beträgt 0.1-0.3 pkat. Es wurden die gleichen Elutionsbedingungen wie unter A 3.1. gewählt.

2.3. Anreicherung der Raucaffricin β -D-glucosidase

2.3.1. Isolierung des Enzyms

100 g tiefgefrorenes Gewebe von R. serpentina (18 Tage gewachsen im AP-Medium) wurden mit 200 ml 0.1 M KPi-Puffer (pH 7.0, mit 10 mM MSH) eine Stunde gerührt. Das aufgetaute Zellmaterial wurde durch Mull filtriert und anschließend durch Zentrifugation von unlöslichen Zellbestandteilen befreit. Nach einer 0-70%igen Ammoniumsulfatfällung wurde der Proteinniederschlag abzentrifugiert, in 5 ml 0.1 M KPi-Puffer (pH 7.0) gelöst und durch Gelfiltration an Sephadex G-25 entsalzt (Säule 2,8 x 30 cm, Flußrate 5 ml/min, 0.1M KPi-Puffer ohne MSH).

Die Proteinausbeute betrug 33.6 mg (Gesamtaktivität 9.24 nkat, spezifische Aktivität 0.275 nkat/mg Protein).

2.3.2. Gelchromatographie an TSK 55-S

Im anschließenden Reinigungsschritt wurde der Proteinrohextrakt (8 ml mit 0.5 ml Glycerin) einer Gelchromatographie unterzogen. Das verwendete TSK 55-S Material, ein hydrophiles Vinylpolymerisat (Korngröße 25-40 μm), weist einen Fraktionierungsbereich von 1-1000 kD für globuläre Proteine auf.

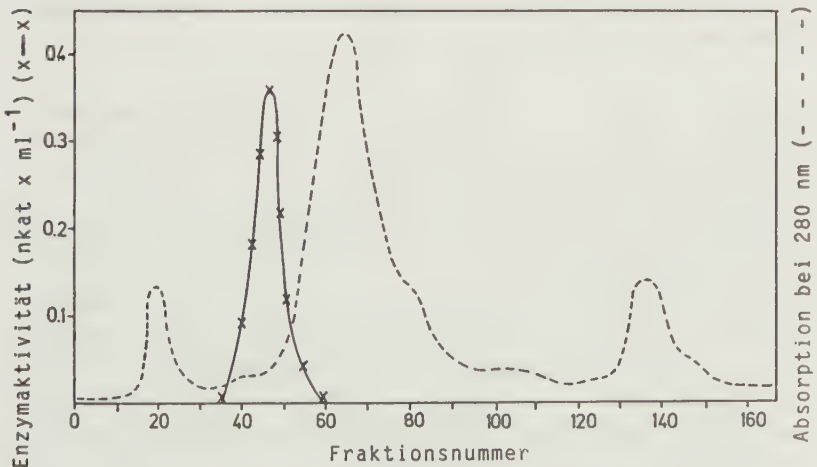


Abb.32 : Auftrennung eines Proteinextraktes von R. serpentina durch Gelfiltration mit TSK 55-S

Die Elutionsbedingungen wurden folgendermaßen gewählt:

Säulendimension	2.6 x 85 cm
Flußrate	20 ml/h
Fraktionsgröße	3 ml
vereinigte Fraktionen	40-50

Abb.32 zeigt das typische, in 5 Läufen reproduzierbare Elutionsprofil der Auftrennung eines Proteinrohextraktes von R.serpentina.

Nach diesem Reinigungsschritt blieben 91% der Gesamtaktivität der Raucaffricinglucosidase erhalten, verbunden mit einer 14.8fachen Enzymanreicherung (spezifische Aktivität 4.0 nkat/mg Protein).

2.3.3. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)- Ionenaustauschchromatographie

Der wesentliche Vorteil dieser neuen Reinigungsmethode besteht darin, daß ein Chromatographielauf nur relativ kurze Zeit beansprucht. Gute Trennleistungen sind mit dem FPLC-Verfahren auch bei Flußraten über 100 ml/Std. erzielbar.

Zum Einsatz kam eine Anionenaustauschersäule (MONO Q HR 5/5, 5 x 50 mm, 10µm Partikeldurchmesser, von PHARMACIA). In 3 aufeinanderfolgenden Läufen mit jeweils 10 ml (0.7 mg) aufgegebenen Proteinlösung konnten 80% der Enzymaktivität zurückgewonnen werden (spez. Aktivität 375 nkat/mg Protein, Flußrate 1 ml/min., 20 mM Tris-Puffer pH 7.5, Fraktionsgröße 1ml). Durch den hiermit erzielten 93fachen Reinigungsfaktor ergab sich eine ca. 1300fache Gesamtanreicherung der Glucosidase.

Wie aus Abb. 33 ersichtlich, erscheinen ca. 90% des Fremdproteins in der Frontfraktion, werden also nur sehr schwach vom Ionenaustauscher zurückgehalten. Die wesentlich stärker gebundene Raucaffricinglucosidase hingegen wird erst nach linearer Steigerung der KCl-Konzentration (bei 275 mM) von der Säule eluiert.

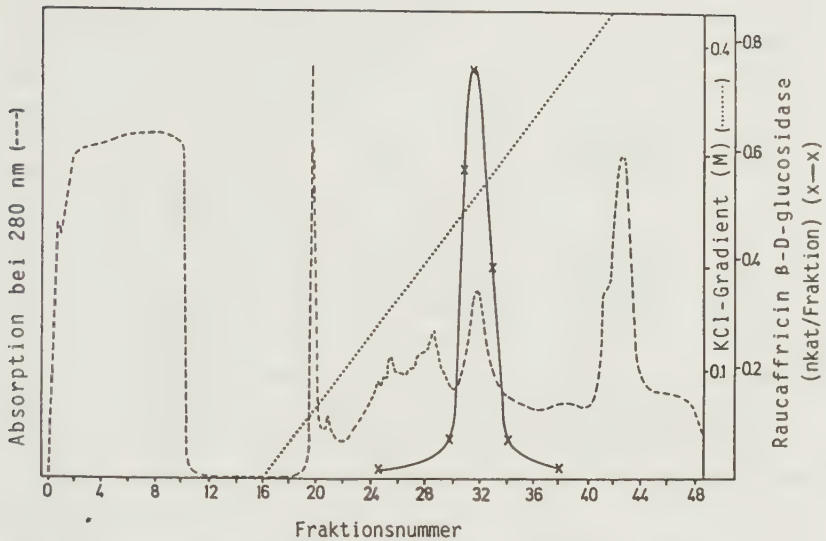


Abb.33 : Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Elutionsprofil zur Anreicherung der Raucaffricin β-D-glucosidase aus R. serpentina-Suspensionskulturen

Die Anreicherungstabelle (Tab.5) faßt die einzelnen Reinigungsschritte der Raucaffricinglucosidase zusammen.

2.3.4. Enzymanreicherung durch HPLC

Als Alternative zur FPLC-Chromatographie wurde die hinsichtlich der kurzen Elutionsdauer als ebenbürtig anzusehende HPLC-Methode zur Proteinreinigung getestet. Zur Verfügung stand eine ULTRA Pac TSK G 3000-SW Säule (0.75 x 60 cm, 10 µm Partikelgröße, LKB). Das Säulenmaterial ist besonders zur Trennung von Proteinen des Molekulargewichtsbereichs von 1-300 kD geeignet. Es wurden 0.2 ml (0.84 mg Protein, 2.7 nkat/mg Protein) eines gelchromatographierten AcA 54 Eluats auf die Säule injiziert. Die HPLC-Elution erfolgte mit 0.1 M KPi-Puffer/0.1 M NaCl (1:1, pH 6.0) bei einer Flußrate von 0.2 ml/min. (12 bar). Die Raucaffricinglucosidase-haltigen Fraktionen (je 0.9 ml) Nr. 18-22 wurden vereinigt. Die dar-

Reinigungsschritt	Gesamt- volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (nkat)	spez. Akt- ivität (nkat/mg)	Aus- beute (%)	Anrei- cherung (x-fach)
Sephadex G-25	8	33.6	9.24	0.275	100	1.0
Gelchromatographie mit TSK 55-S	30	2.1	8.40	4.0	90.9	14.8
FPLC Mono Q	12	0.0192	7.20	375	77.9	1364

Tab.5 : Anreicherung der Raucaffricin β -D-glucosidase aus R. serpentina Suspensionskulturen

aus resultierende Enzymmenge betrug 0.06 mg (spez. Aktivität 8.3 nkat/mg Protein) entsprechend einer 3.1fachen Anreicherung. Somit wurden bei der HPLC-Proteintrennung 22%, mittels FPLC-Elution hingegen 90% der Enzymaktivität erhalten.

2.4. Charakterisierung der Raucaffricin β -D-glucosidase

Die Charakterisierung eines neuen Pflanzenenzym ist einerseits von theoretischem Interesse. Hierdurch lassen sich in vielen Fällen biosynthetische Zusammenhänge besser verstehen, taxonomische Einteilungen werden ermöglicht, sowie das Wissen über die entsprechenden Enzymmechanismen vertieft. Die Untersuchung und Aufklärung enzymatischer Reaktionsabläufe stellt andererseits eine essentielle Grundlage für biomimetische Synthesen dar. Darüberhinaus ist die Kenntnis kinetischer Daten eines Enzyms notwendig für einen präparativen Einsatz. Im Fall der Raucaffricinglucosidase galt es, herauszufinden, unter welchen Bedingungen die enzymatische Spaltung des Raucaffricins am effektivsten ablaufe. Angestrebtes Ziel war die präparative Anwendung der aus der Enzymcharakterisierung gewonnenen Erkenntnisse.

2.4.1. Temperaturabhängigkeit

Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums einer enzymatischen Reaktion ist zu beachten, daß durch Temperatursteigerung Proteine inaktiviert werden können, die Reaktionsgeschwindigkeit hingegen bei höherer Temperatur zunimmt. Der Einfluß verschiedener Temperaturen, bei gleicher Inkubationszeit (30 Min) wurde unter Standardbedingungen mit 0.1 nkat Enzym (14fach angereichert) gemessen. Um eine Beeinträchtigung der Hilfsenzyme (Glucoseoxidase, Peroxidase) auszuschließen, wurden diese erst unmittelbar vor der photometrischen Auswertung zugegeben. Das Temperaturoptimum (siehe Abb. 34) wurde zu 38°C bestimmt. Unter den angegebenen Bedingungen bleiben bei 55°C noch 50% der Enzymaktivität erhalten.

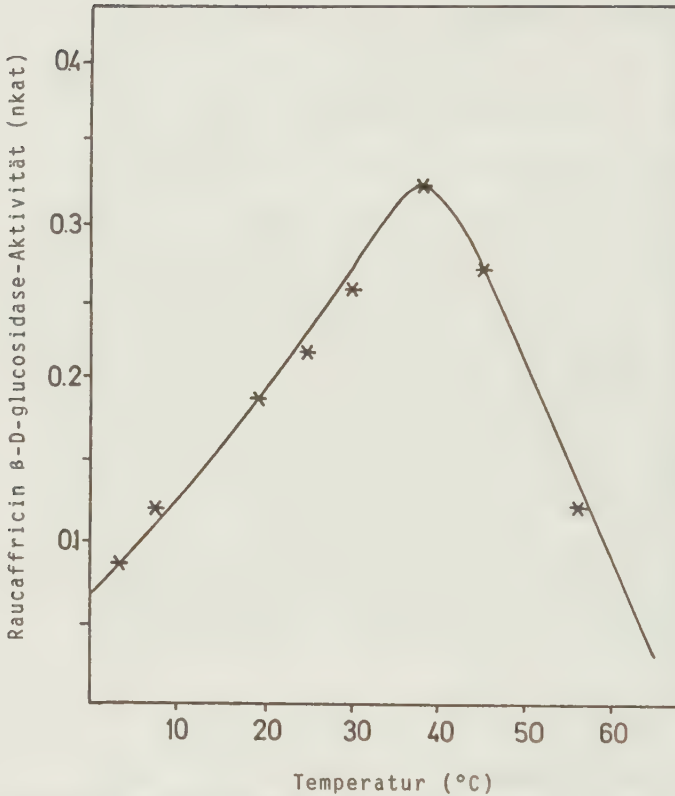


Abb.34 : Temperaturabhängigkeit der Raucaffricinglucosidase-Reaktion

2.4.2. pH-Optimum

Die Messungen erfolgten mit dem HPLC- und auch mit dem oben beschriebenen photometrischen Testsystem (siehe 2.2.). Das pH-Optimum wurde in beiden Untersuchungen zu pH 5.1 bestimmt. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit pH-Optima anderer pflanzlicher β -Glucosidasen (siehe MARCINOWSKI et al. 1978, HEMSCHIEDT et al. 1980). Das hier untersuchte Enzym zeigt eine relativ breite pH-Toleranz. So ist bei pH 4.2 bzw. 5.8 jeweils noch die halbmaximale Aktivität der Glucosidase zu beobachten (Abb. 35).

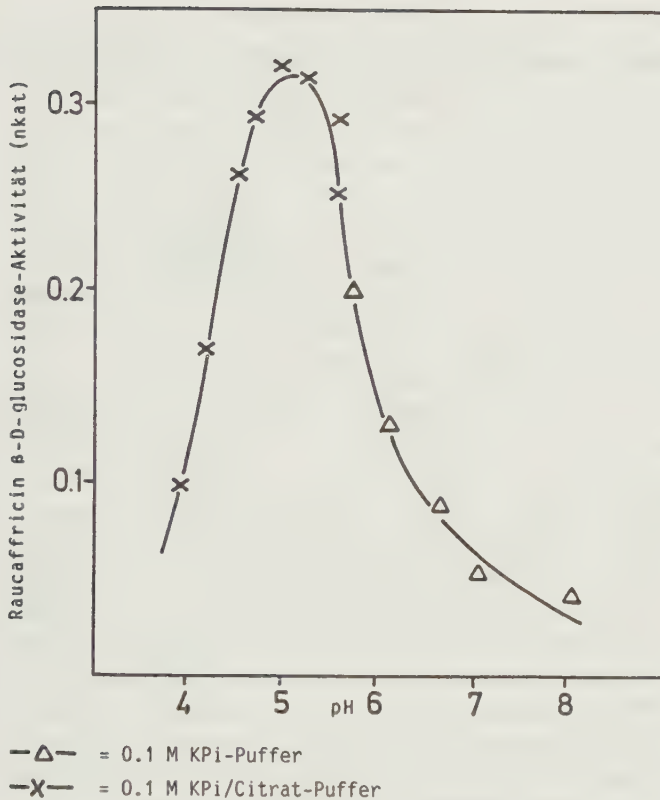


Abb.35 : pH-Abhängigkeit der Raucaffricinglucosidase-Reaktion

2.4.3. Molekulargewichtsbestimmung

Das relative Molekulargewicht der Glucosidase ($66600 \pm 5\%$) wurde durch Gelchromatographie an einer geeichten AcA 54 Säule bestimmt (Säulenmaße 2.3×92 cm, 0.1 M KPi-Puffer, pH 7.0, Flußrate 20 ml/Std.). Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Cytochrom c (MG_{rel} 12500), Chymotrypsinogen A (25000), Ovalalbumin (45000) und Rinderserumalbumin (68000). Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde eine MG-Bestimmung mit einer geeichten TSK G 3000-SW HPLC-Säule durchgeführt. Der hierbei ermittelte Wert betrug 65100.

2.4.4. Ermittlung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt (IEP) wurde durch Chromatofokussierung nach der Methode von RIGHETTI et al. (1984) bestimmt. Mit diesem elektrophoretischen Verfahren werden Proteine aufgrund ihrer zwitterionischen Natur im elektrischen Feld getrennt. Als Trägermaterial wird eine Matrix verwendet, in der ein stabiler pH-Gradient ausgebildet ist. Ein Protein wandert in einem solchen System bis zu der Stelle des pH-Gradienten, an der es keine Nettoladung mehr besitzt. Der pH-Wert an dieser Stelle des Gradienten entspricht zahlenmäßig dem isoelektrischen Punkt des Proteins.

Die Herstellung des linearen pH-Gradienten (pH 4-10) erfolgte mit einem Immobiline Kit (LKB) durch Einpolymerisierung in Acrylamidgel (10 x 10 x 0.5 cm). 100 µl der Enzympräparation (0.4 mg, 0.3 nkat/mg Protein) wurden anschließend dem System appliziert. Nach erfolgter Proteintrennung wurde das Gel in 0.5 cm breite Banden zerschnitten. Die Gelstückchen wurden in Eppendorfgefäße überführt, mit je 200 µl 0.1 M KPi-Puffer (pH 6.0) versetzt und mit dem optischen Test (siehe 2.2.1.) auf Raucaffricinglucosidase geprüft. Es resultierte ein scharfes Intensitätsmaximum, entsprechend einem IEP von 5.8 ± 0.2 . Die angewandte Aktivitätsfärbung läßt erkennen, daß die Chromatofokussierung auch zur präparativen Enzymtrennung geeignet ist. Eine Anwendung dieser Methode sollte deshalb noch reinere Präparationen der Raucaffricinglucosidase als bisher ergeben.

2.4.5. Einfluß der Substratkonzentration

Für einen präparativen Einsatz der Glucosidase ist es unumgänglich zu wissen, ob bei hohem Substratüberschuß eine Hemmung der Enzymreaktion auftritt. Der Einfluß der Raucaffricinkonzentration wurde mit den Testsystemen 2.2.1. und 2.2.2. quantifiziert. Im Testvolumen von 1 ml wurden jeweils 0.7 nkat Enzym (4 nkat/mg Protein) eingesetzt. Abb. 36 zeigt die Glucosidaseaktivität in Abhängigkeit der Raucaffricinkonzentration. Es ergibt sich eine normale MICHAELIS-MENTEN

Kinetik. Auch bei einem Substratüberschuß von 6 mM Raucaffricin konnte keine Hemmung des Enzyms gemessen werden.

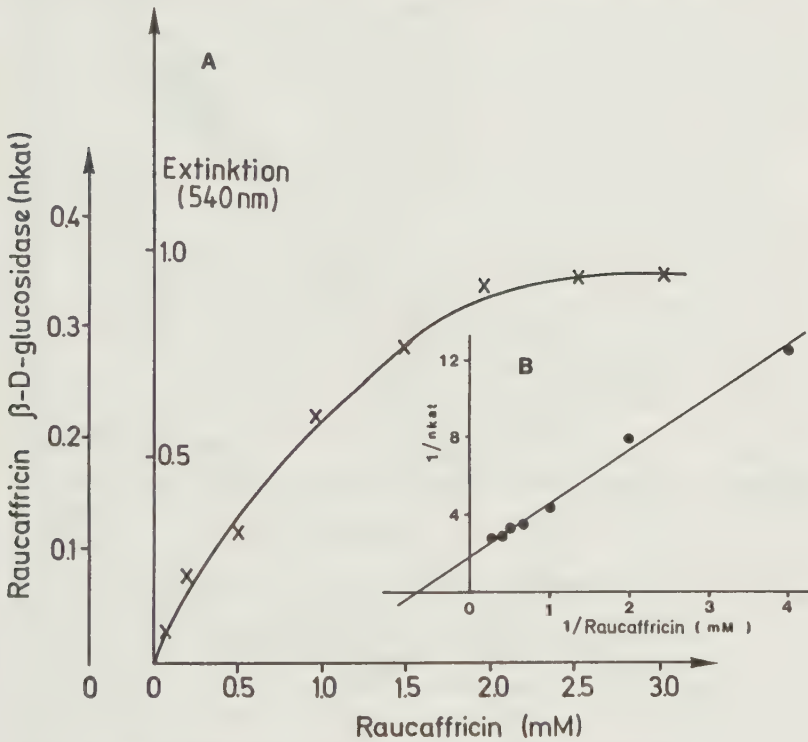


Abb.36 : Substratabhängigkeit der Raucaffricinglucosidase

A : MICHAELIS-MENTEN Kinetik

B : LINEWEAVER-BURK Darstellung

K_m : 1.43 mM V_{max} : 556 pkat

Aus der linearisierten Form nach LINEWEAVER BURK sind $-1/K_m = -0.7 \text{ mM}$ und $1/V_{max} = 1.8 \text{ nkat}$ ablesbar. Daraus errechnet sich eine MICHAELIS^{max}MENTEN Konstante von 1.43 mM bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 556 pkat. Genauere Ergebnisse als die Reziprokauftragung liefert die direkte lineare Darstellung nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN (vgl. AHLERS 1982). Die gemessenen Wertepaare (z.B. V_1, S_1) werden auf der Ordi-

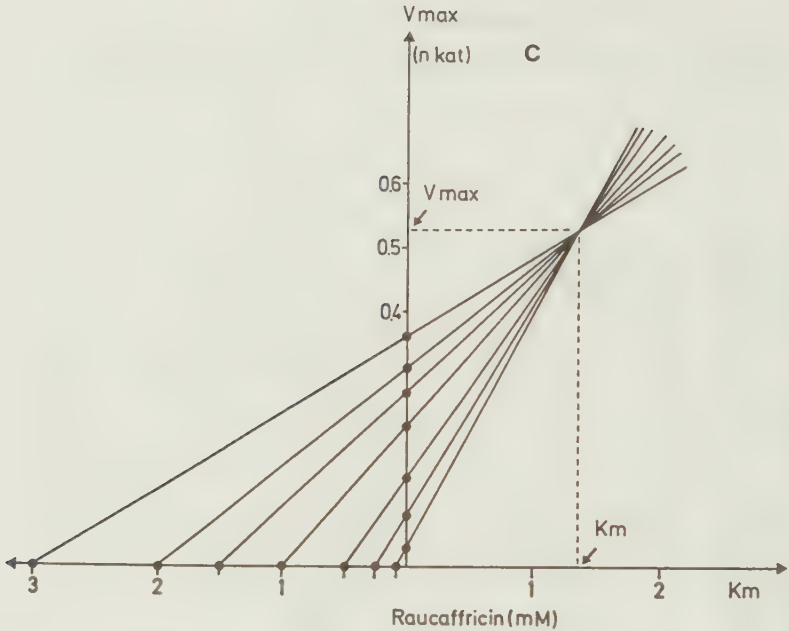


Abb.36 C : Substratabhängigkeit der Raucaffricinglucosidase

Auswertung nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN

K_m : 1.38 mM

V_{max} : 525 pkat

nate und Abszisse eingetragen (Abb. 36C). Durch die beiden Meßpunkte werden jeweils Geraden festgelegt, die sich in einem Punkt schneiden. Aus den Koordinaten des Schnittpunktes kann direkt der V_{max} - und K_m -Wert ermittelt werden. Nach dieser Bestimmungsmethode ergibt sich für die Raucaffricinglucosidase ein K_m von 1.38 mM bei einer V_{max} von 525 pkat.

2.4.6. Versuche zur Hemmung der Raucaffricinglucosidase

Hemmstoffstudien dienen im wesentlichen der Erkennung spezifischer Bindungsstellen eines Enzyms. Darüberhinaus stellen sie auch die Grundlage dar für eine Anwendung von Enzyminhibitoren unter in vivo Bedingungen. Ein aus der Literatur be-

kannter Glucosidaseinhibitor, 6-Gluconolacton (CONCHIE et al. 1957), zeigte in Konzentrationen von 0 bis 1 M keine hemmende Wirkung auf die enzymatische Raucaffricinspaltung. Glucanolacton bewirkt in wässriger Lösung infolge Hydrolyse eine pH Erniedrigung. Die Reaktionsansätze wurden deshalb stets auf pH 6.0 eingestellt. Ebenso wenig war eine Enzymhemmung zu verzeichnen bei 0 - 80 mM Konzentrationen von Phenylmethylsulfonylfluorid, EDTA oder Jodacetamid (vgl. WALSH 1981).

Auch in Gegenwart der Glycoside Strictosidin und Amygdalin (0 - 50 mM) wurde keine Hemmung der Glucosidase registriert. Die Untersuchungen zur Raucaffricinglucosidasehemmung wurden in 0.5 ml Gesamtvolumen durchgeführt (0.1 M KPi-Puffer, pH 6.0). Nach 20-minütiger Vorinkubation des Hemmstoffes mit 0.1 nkat Glucosidase wurde das Substrat (0.5 μ Mol Raucaffricin) hinzugegeben. Die Auswertung des Tests erfolgte mit der HPLC-Methode wie unter B.2.2.2. beschrieben.

Im folgenden wurde der Einfluß von Zuckern auf die Glucosidase-reaktion überprüft. Fructose, Glucose sowie der Zuckeralkohol Mannit wurden in 0 bis 1 molaren Konzentrationen mit 0.1 nkat Raucaffricinglucosidase in 1 ml 0.1 M KPi-Puffer (pH 6.0) 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Zusatz von 0.5 μ Mol Raucaffricin. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Testansätze HPLC-chromatographisch analysiert. Abb.37 illustriert die Abhängigkeit der enzymatischen Raucaffricinhydrolyse in Gegenwart der oben genannten Zucker.

Während bei Mannit kein Effekt erkennbar ist, konnte bei 0.8 molarer Glucosekonzentration vollständige, bei 0.95 molarer Fructosekonzentration hingegen 30%ige Hemmung der Raucaffricinspaltung verzeichnet werden. Da eine Isomerisierung von Fructose in Glucose die Testergebnisse verfälschen würde, erfolgte die Überprüfung dieser Reaktionsmöglichkeit. Die eingesetzten Cofaktor-freien Proteinextrakte aus R. serpentina wandelten jedoch Fructose nicht in Glucose um.

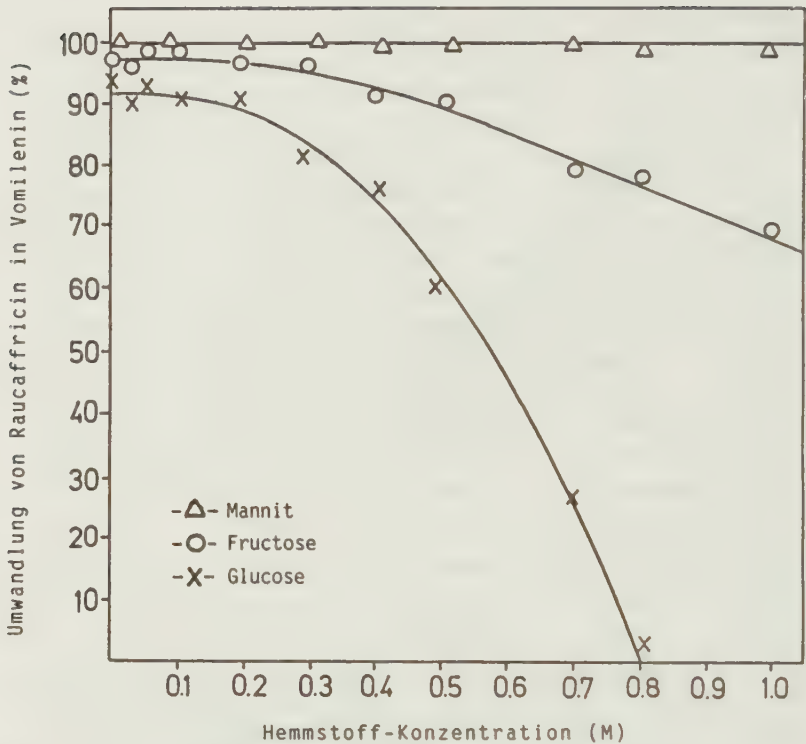


Abb.37 : Beeinträchtigung der Raucaffricinglucosidase-Reaktion durch Zucker

2.4.7. Taxonomische Verbreitung des Enzyms

Ein Zusammenhang zwischen der Verbreitung eines Enzyms in verschiedenen Pflanzenarten und dem Vorkommen seiner Substrate ist ein wichtiges Indiz für die biosynthetische Relevanz der gemessenen Enzymaktivität.

Wie in Abschnitt A.2.2.1. ausgeführt, konnte Raucaffricin bislang in 4 Zellkulturen unterschiedlicher Rauwolfia Arten nachgewiesen werden. Eine Untersuchung verschiedener Pflanzen und Zellkulturen sollte nun Aufschluß geben über die Verbreitung der Raucaffricinglucosidase. Andererseits galt es, das optimale Ausgangsmaterial für die Isolierung dieses Enzyms herauszufinden.

Aus 50 g Frischgewicht des jeweiligen Zellmaterials wurde nach bekannten Methoden (II.9.) ein Proteinextrakt hergestellt. Nach 20-stündiger Dialyse gegen 0.1 M KPi-Puffer (pH 6.0) erfolgte die Bestimmung der Raucaffricinglucosidase-aktivität unter Anwendung des HPLC-Tests (B.2.2.2.). Bei nicht detektierbarer Enzymaktivität wurde das Experiment mit 10facher Proteinmenge wiederholt. Von 4 getesteten Pflanzen sowie 8 Zellkulturen konnte nur in Zellkulturen von Rauwolfia Arten das Raucaffricin-spaltende Enzym nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis läßt erkennen, daß eine enge Korrelation zwischen Substrat und entsprechender Enzymverbreitung besteht.

Der quantitative Vergleich der Glucosidase-haltigen Rauwolfia Zellkulturen bekräftigt auch im Hinblick auf das Enzymvorkommen die herausragende Stellung der Zellkulturen von Rauwolfia serpentina (siehe Tab. 6).

Zellkultur	Medium	mg Protein / l Medium	nkat Raucaffri- cinglucosidase / l Medium	pkat / mg Protein
<u>R. serpentina</u> Benth.	LS	185	101	546
<u>R. caffra</u> Sond.	4X	160	40	250
<u>R. verticillata</u> Chevallier	LS	108	15	138
<u>R. mannii</u> Stapf.	DAX	105	5	48

Tab.6 : Vergleich verschiedener Rauwolfia-Zellkulturen auf das Vorkommen von Raucaffricin β -D-glucosidase

In den im folgenden aufgeführten Zellkulturen und Pflanzen konnte weder Raucaffricin noch Raucaffricinglucosidase-Aktivität detektiert werden:

Catharanthus roseus G.Don, Rhazya stricta Decne., Uncaria gambir (Hunter) Roxb., Voacanga africana Stapf., Tabernanthe iboga Baill., Tabernaemontana divaricata R.Br.ex Roem et Schult., Ochrosia elliptica Labill. sowie Blättern von Catharanthus roseus.

2.4.8. Substratspezifität

Eine wichtige Frage bleibt noch zu beantworten im Hinblick auf den präparativen Einsatz der Raucaffricinglucosidase: Inwieweit läßt sich Raucaffricin chemisch modifizieren und anschließend enzymatisch das Aglycon freisetzen?

Hierzu wurden 15 verschiedene Derivate mit glycosidischer Bindung in Gegenwart von Raucaffricinglucosidase inkubiert (0.6 nkat Enzym, 0.1 M KPi-Puffer pH 6.0, 1 ml Gesamtvolumen). Die Auswertung erfolgte mit dem photometrischen Test (B.2. 2.1.). Strictosidin, eine biosynthetische Vorstufe des Raucaffricins wird nicht umgesetzt. Nur synthetisch hergestellte Raucaffricinderivate (siehe C.4.) wurden ebenfalls als Substrat akzeptiert. Tab.7 gibt die ermittelten K_m und V_{max} -Werte wieder, wobei die Substratkonzentration von 0 - 6 mM variiert wurde.

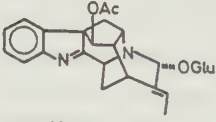
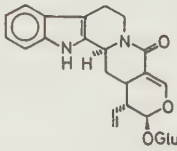
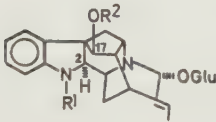
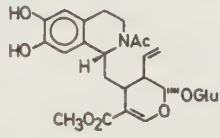
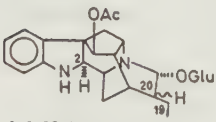
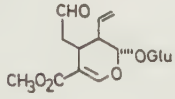
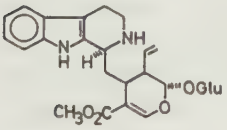
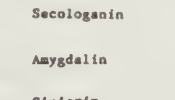
Die Reduktion der Indolenindoppelbindung hatte nur einen geringen Einfluß auf den K_m - und V_{max} -Wert.

$N_{(\alpha)}$ -Methyl-1,2-dihydroucaffricin wird hingegen, wie Tab.7 demonstriert, vom Enzym deutlich schlechter als Substrat akzeptiert

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit der Raucaffricinglucosidase eine weitere β -Glucosidase mit ausgesprochen hoher Substratspezifität gefunden wurde, für die bisher nur ein natürliches Substrat bekannt ist.

2.4.9. Enzymstabilität

Für die präparative Herstellung von Vomilenin und derivatisierter Alkaloide durch enzymatische Entglucosidierung mußten noch zwei Bedingungen erfüllt werden. Zum einen sollte die relativ zeitintensive Enzymisolierung soweit wie möglich eingeschränkt werden. Der Arbeitsaufwand zur Herstellung eines entsalzten Proteinrohextraktes beträgt ca.5 Stunden. Zum anderen mußte das Enzym stabilisiert werden, um es analog einem chemischen Katalysator bei Bedarf einsetzen zu können. Es wurde deshalb durch Wasserentzug gefriergetrocknetes Enzym hergestellt und diese Präparation auf seine Stabilität während der Lagerung untersucht.

Glycosid	Rel. Aktivität (%)	K _m (mM)	V _{max} (pkat)	Glycosid	Rel. Aktivität (%)
 Raucaffricin	100	1.4	560	 Strictosidinlactam	0
 1.2-Dihydroucaffricin (R ¹ =H, R ² =Ac)	98	1.5	550	 Ipecosid	0
1.2-Dihydro-17-O-desacetyl-raucaffricin (R ¹ =R ² =H)	95	1.7	530		
N-(α)-Methyl-1.2-dihydroucaffricin. (R ¹ =CH ₃ , R ² =Ac)	36	1.4	200		
 1.2.19.20-Tetrahydroucaffricin	87	2.0	490	 Secologanin	0
 Strictosidin	0	-	-	 Amygdalin	0
				Sinigrin	0
				Vanillin-β-D-glucosid	0
				Saccharose	0
				Lactose	0
				p-Nitrophenyl-β-D-glucosid	0

Tab.7 : Substratspezifität der Raucaffricin-glucosidase

Von 10 ml eines *R.serpentina* Proteinrohextraktes (7 mg Protein/ml, spez. Aktivität 0.4 nkat/mg Protein, 0.1 M KPi-Puffer pH 6.0) wurden 5 ml mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die verbliebenen 5 ml wurden

bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach 6 Std. wurde das trockene, pulvrige Lyophilisat wieder mit 5 ml H₂O versetzt. Die Bestimmung der Umsatzrate beider Enzympräparationen erfolgte HPLC-chromatographisch.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten resultierte ein 25%iger Aktivitätsverlust durch die Gefriertrocknung. Im Verlauf einer 4-monatigen Lagerung eines in Lösung verbliebenen (G-25)-Proteinrohextraktes bei 4°C war eine 30%ige Aktivitätsminderung registrierbar. Im Vergleich hierzu konnten bei der Aufbewahrung einer lyophilisierten Enzympräparation im gleichen Zeitraum keine meßbaren Aktivitätsverluste festgestellt werden.

2.5. Präparative zellfreie Vomileninsynthese

Da aus R.serpentina sowohl Raucaffricin als auch die entsprechende Glucosidase isolierbar ist, liegt der Schluß nahe, daß Enzym und Substrat in der intakten Zelle nicht miteinander in Kontakt treten. Eine Aufhebung dieser Kompartimentierung, d.h. ein Zerfallen der inneren Zellstrukturen wird durch Wasserentzug erreicht und sollte zur Spaltung des Glucoalkaloids führen. Folgendes Experiment wurde hierzu ausgeführt: R.serpentina Zellen (500 g Frischgewicht, 18 Tage gewachsen in AP-Medium) wurden 6 Tage an der Luft bei 25°C getrocknet. Nach diesem Trocknungsprozeß waren nur noch 30% der ursprünglichen Raucaffricinmenge isolierbar. Zur quantitativen Glucosidisolierung muß deshalb der Wasserentzug schnell und bei tiefen Temperaturen durch Gefriertrocknung ausgeführt werden.

Für eine präparative Darstellung des Vomilenins ist eine Lufttrocknung des Pflanzengewebes infolge der Instabilität des Alkaloids ebenfalls ungeeignet.

Im folgenden wurde deshalb stets eine zellfreie Raucaffricinhydrolyse durchgeführt. Inkubiert man Raucaffricin mit einem R.serpentina Proteinextrakt, so fällt mit fortschreitender Hydrolyse das in Wasser schwerlösliche Aglycon aus. Bei Verwendung eines Zweiphasensystems aus Ethylacetat und Wasser hingegen bleibt das entstandene Vomilenin in Lösung. In

Abb. 38 ist die Apparatur skizziert, die zur Vomilenindarstellung im Gramm-Maßstab eingesetzt wurde. Hierfür wird lediglich ein längliches Reaktionsgefäß (z.B. 500 ml Meßzylinder) benötigt, in dem sich die wässrige Enzymlösung befindet. Portionsweise kann nun Raucaffricin, ebenfalls in Wasser gut löslich, zugegeben werden.

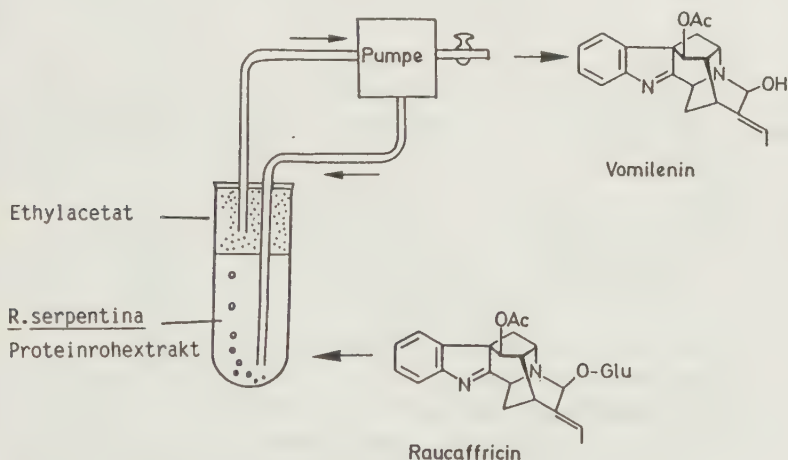


Abb.38 : Präparative zellfreie Vomileninsynthese

Das gebildete labile Aglycon Vomilenin wird durch Hindurchleiten von Ethylacetat kontinuierlich bis zum vollständigen Umsatz der wässrigen Phase entzogen. Anschließend kann das Enzym wiederverwendet werden, indem eine neue Portion Raucaffricin zugegeben und der Vorgang wiederholt wird. Der Fortgang der enzymatischen Spaltung wird durch Probennahme und anschließende HPLC-chromatographische Auswertung kontinuierlich verfolgt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man Vomilenin als reines Spaltprodukt des Glucoalkaloids. Mit der beschriebenen Apparatur wurden bei 3 maliger Zugabe von je 0.5 g Raucaffricin mit 150 mg Proteinrohextrakt 0.87g Vomilenin (85%) synthetisiert (Abb. 39). Eine spektroskopische Charakterisierung von Vomilenin wird in Kapitel C.8.1. diskutiert.

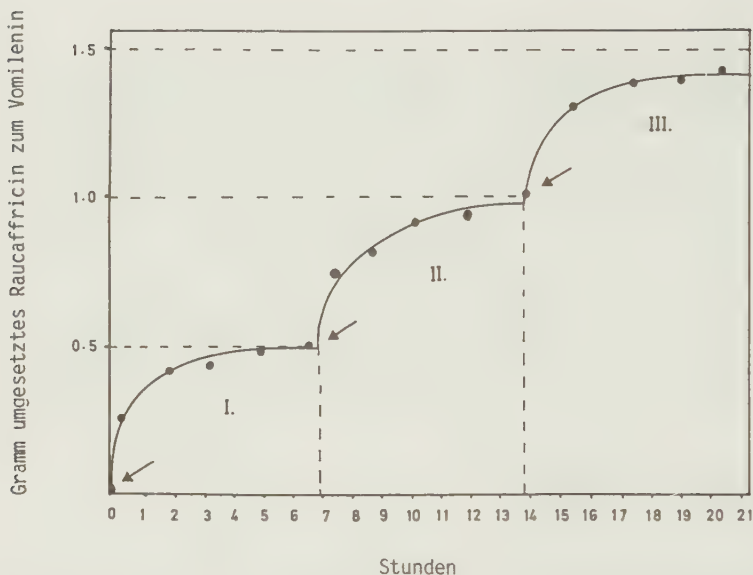


Abb.39 : Kontinuierliche Vomileninfreisetzung aus Raucaffricin im Zweiphasensystem
(Die Pfeile symbolisieren jeweils die Zugabe von 0.5 g Raucaffricin zur gleichen Enzympräparation)

3. Enzymatische Raucaffricinsynthese aus Perakin

3.1. Enzymatische Reduktion von Perakin

Enzymatische Umsetzungen sollten im Rahmen dieser Arbeit stets dann zum Einsatz kommen, wenn chemische Methoden nicht, oder wesentlich aufwendiger zum Ziel führen würden. Sowohl für die enzymatische Strictosidin- als auch Vomilenindarstellung gibt es derzeit keine gleichwertige chemische Alternative. Beide Reaktionsprodukte stellen reaktive, damit für weitere Umsetzungen sehr interessante Verbindungen dar. Als drittes Beispiel wird eine selektive Reduktionsmöglichkeit mit pflanzlichen Sekundärstoffenzymen vorgestellt.

Perakin (Abb. 40), ein Umlagerungsprodukt von Vomilenin (ULSHAFFER et al. 1961, TAYLOR et al. 1962), konnte bisher nicht als Inhaltsstoff von R.serpentina nachgewiesen werden. Die enzymkatalysierte Reduktion von Perakin ermöglicht die Biotransformation zu Raucaffrinolin, ein Alkaloid, das zum ersten Mal aus R.caffra Sond. isoliert wurde (KHAN et al. 1972).

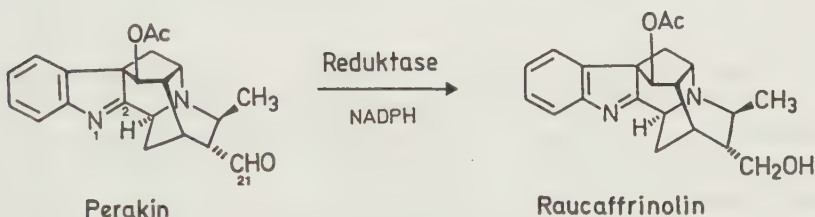


Abb.40 : Enzymatische Reduktion von Perakin zu Raucaffrinolin

5 mg Perakin (1.4 μMol) wurden in 50 μl MeOH gelöst und unter Rühren zu 4 ml einer wässrigen Lösung gegeben, die 10 mg R.serpentina Proteinrohextrakt sowie 5 mg NADPH enthielt. Nach 2-stündiger Reaktionsdauer erfolgte die Extraktion mit 3 mal 10 ml Dichlormethan. Durch dünnschichtchromatographische Analyse konnte kein Perakin mehr detektiert werden, sondern ein Umsetzungsprodukt (R_f 0.35 in FMS 6). Die Ausbeute, UV-spektroskopisch bestimmt, betrug 0.39 mg (78%). Das Reaktionsprodukt wies folgende spektroskopische Daten auf:

UV (MeOH) λ_{max}	: 260, 222 nm
EI-MS m/z (rel.Int.%)	: 352 (M^+ , 100), 335 (32), 321 (26),
	309 (18), 293 (10), 196 (49), 180
	(19), 169 (52), 168 (92), 140 (21),
	130 (29)

EI-MS des Acetylierungsprodukts (siehe II.6.2.): 394 (M^+ , 29), 336 (24), 335 (100), 196 (10), 169 (13), 168 (19).

Die UV-Spektren der Substanz als auch des monoacetylierten Produkts wiesen die für eine Indoleningruppierung typischen

Maxima auf ($\lambda_{\max}$ 260, 220 nm). Weiterhin war nicht die bei Ausbildung des Norajmalingerüsts charakteristische orange Cersulfatanfärbung zu verzeichnen, was auf den Erhalt der Indoleninstruktur hinwies. Den endgültigen Beweis für die Struktur des Reduktionsproduktes (Abb.40) erbrachte die NMR-Spektroskopie. Abb. 41 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des enzymatisch hergestellten Raucaffrinolins. Abb. 42 gibt das bei einer chemischen Perakinreduktion als Nebenprodukt entstandene Dihydroperakin wieder.

Im Gegensatz zu Perakin (^1H -NMR-Spektrum siehe 5.2.1.) fehlt beiden reduzierten Verbindungen jeweils das Proton der Aldehydfunktion bei 9.9ppm. Hingegen treten bei den Reduktionsprodukten deutlich zwei neue Signale zwischen 3.8 und 3.9 ppm der CH_2 -Gruppierung auf. Der Vergleich des übrigen Teils des Spektrums wie auch der MS- und UV-Daten bestätigt die Identität der beiden Substanzen. Bei chemischer Reduktion von Perakin, z.B. mit NaCNBH_3 , ist Raucaffrinolin nur als Nebenprodukt zugänglich, da bevorzugt die 1,2-Doppelbindung reduziert wird. Die Selektivität der enzymatischen Reduktion ermöglicht also eine einfache zellfreie Raucaffrinolinsynthese, insbesondere wenn NADPH-regenerierende Enzymsysteme verwendet würden.

3.2. Überprüfung der enzymatischen Perakindarstellung aus Vomilenin

Hinsichtlich der biosynthetischen Stellung des Raucaffrinolins blieb zu untersuchen, ob sein Vorläufer Perakin enzymatisch aus Vomilenin gebildet wird. TAYLOR et al. (1962) äußerten die Vermutung, daß Perakin während der Alkaloidaufarbeitung aus Vomilenin entstehen kann. Zur Untersuchung einer möglichen enzymatischen Bildung von Perakin wurde deshalb Vomilenin mit R.serpentina Proteinextrakt inkubiert. 1.5 nMol ($2.9 \times 10^5 \text{dpm}$) [$5\text{-}^3\text{H}$]Vomilenin, 20 mg R.serpentina Proteinrohextrakt und 0.38 mg ($1.1 \mu\text{Mol}$) Vomilenin wurden in 4 ml 0.1 M KPi-Puffer (pH 7.0) 2 Std. bei 30°C inkubiert. Als Kontrollwert diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Extraktion der Reaktionsprodukte erfolgte mit Essigester. Die dünn-

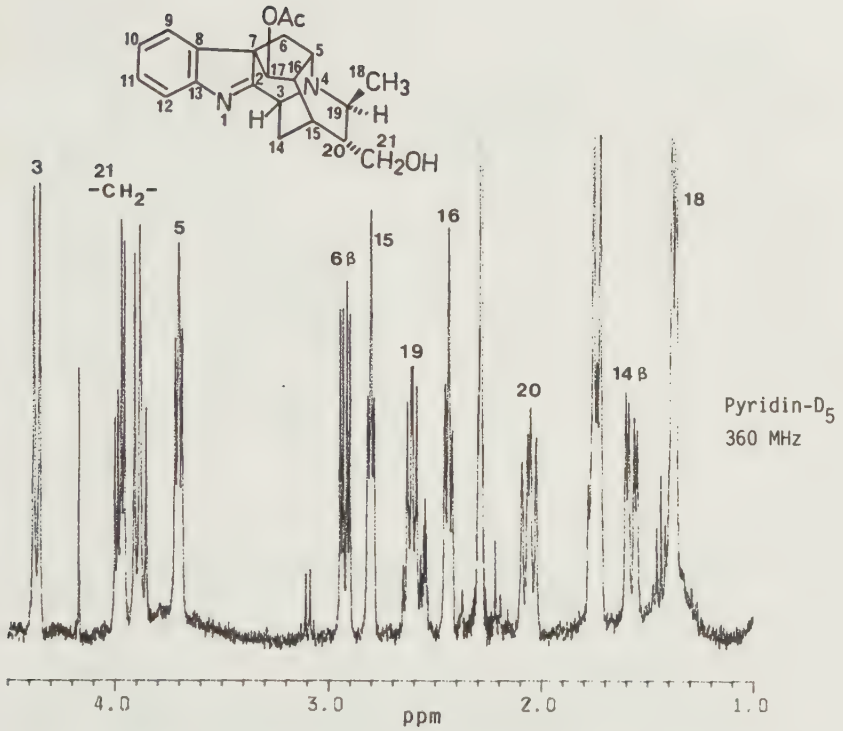


Abb.41 : ¹H-NMR-Spektrum des enzymatischen Perakin-Reduktionsproduktes

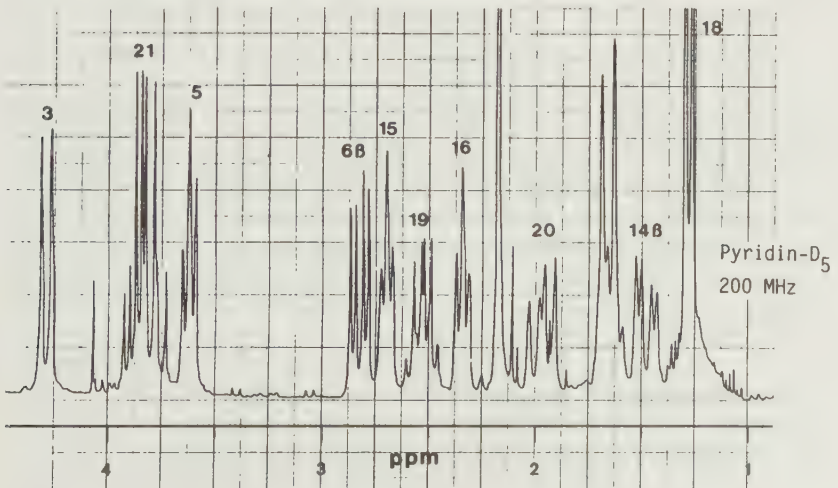


Abb.42 : ¹H-NMR-Spektrum von Dihydro-Perakin (Raucaffrinolin)

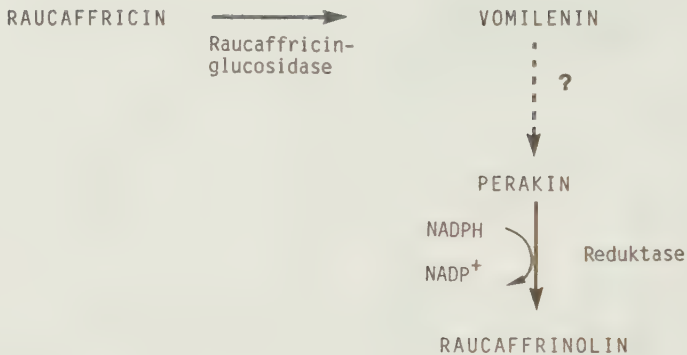


Abb.43 : Möglicher biosynthetischer Zusammenhang zwischen Raucaffricin und Raucaffrinolin

schichtchromatographische Auswertung mit FMS 9 der Radioaktivitätsverteilung ergab bei beiden Experimenten das annähernd gleiche Vomilenin/Perakinverhältnis (3:1). Daraus folgt, daß unter den gewählten Bedingungen Perakin spontan aus Vomilenin entsteht. Bei Abwesenheit von Protein im Reaktionsansatz wurde überraschenderweise aber bei der Extraktion mit Ethylacetat eine um den Faktor 5 erhöhte Radioaktivitätsausbeute erzielt. Dieser Befund weist auf eine mögliche Proteinbindung des Perakins hin. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurden 5 mg Perakin (14 μMol) in 50 μl (MeOH:Aceton 1:1) gelöst und mit steigenden Proteinmengen (0-10 mg BSA) versetzt. Nach 2-stündigem leichtem Schütteln wurden die Ansätze mit Essigester extrahiert und HPLC-chromatographisch untersucht (Abb. 44).

Säule : RP 18, Hibar LiChroCart (7 μm), 0.4 x 25 cm
Elutionsmittel : Acetonitril / 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Gradient : 20 : 80 $\rightarrow$ 60 : 40 in 30 min.
Die Retentionszeit für Perakin beträgt 15.6 min.

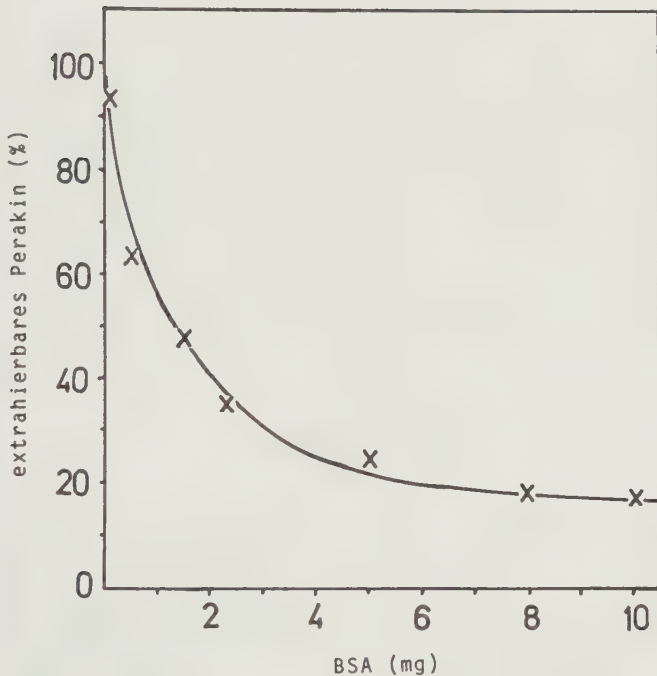


Abb.44 : Abhängigkeit der extrahierbaren Perakinmenge von der BSA-Konzentration im Reaktionsansatz

Bei Substitution des Rinderserumalbumins durch entsprechende Proteinmengen eines R.serpentina Rohextraktes resultierten analoge Ergebnisse. Es ergibt sich eine deutliche Abnahme des extrahierbaren Perakins in Abhängigkeit der im Ansatz befindlichen Proteinmenge. Eine Freisetzung des vom Protein gebundenen Alkaloids ist bisher nicht gelungen. Die Proteinbindung des Perakins kann somit eine Erklärung liefern, daß dieses Alkaloid bislang nicht aus R.serpentina Zellkulturen isoliert werden konnte.

C. Biomimetisch orientierte Synthesen

Wie oben ausgeführt, ermöglichen pflanzliche Zellkulturen die präparative Darstellung und Isolierung des Biosyntheseintermediats Strictosidin (siehe B.1., A.3.). Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, diese Vorstufe gezielt für chemische Synthesen einzusetzen. Beim Glucosid Strictosidin liegt die Reaktivität jedoch zunächst noch in maskierter Form vor, erst nach Abspaltung des Zuckeranteils wird das hoch reaktive Aglycon in Freiheit gesetzt (Abb. 45).

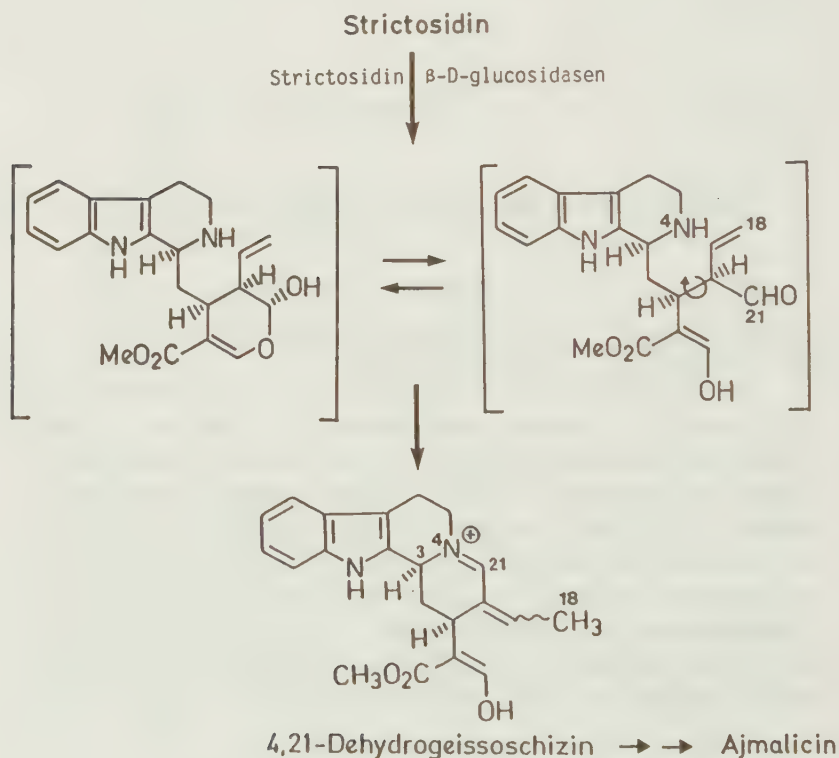


Abb.45 : 4,21-Dehydrogeissoschizin, ein reaktives Intermediat der Ajmalicinbiosynthese

PFITZNER und STÖCKIGT (1982) konnten durch in vitro und in vivo Untersuchungen mit Catharanthus roseus Zellkulturen die Bedeutung des 4,21-Dehydrogeissoschizins für die Biosynthese von Heteroyohimbinalkaloiden beweisen. Der indirekte Nachweis dieses sehr labilen Alkaloids gelang über ein Glycerinadditionsprodukt.

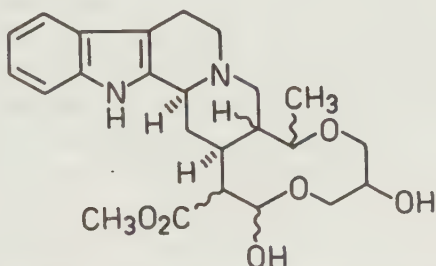


Abb.46 : Glycerinadditionsprodukt von 4,21-Dehydrogeissoschizin, nach PFITZNER (1984)

Drei Jahre zuvor hatten HEINSTEIN, HÖFLE und STÖCKIGT (1979) bei der enzymatischen Synthese von Alkaloiden des Ajmalicin-Typs folgende Verbindung als Nebenprodukt nachweisen können:

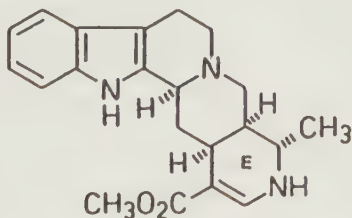


Abb.47 : N-analoges Tetrahydroalstonin, nach HEINSTEIN et al. (1979), HUSSON et al. (1977)

Die Substanz unterscheidet sich vom Ajmalicinisomeren Tetrahydroalstonin durch Austausch des Sauerstoffatoms im E-Ring durch eine NH-Gruppierung. Eine analoge Verbindung war von HUSSON et al. (1977) aus Guettarda eximia (Rubiaceae) isoliert worden. In beiden Fällen war eine Stickstoffquelle (NH_3 , NH_4^+) bei der Aufarbeitung essentiell für die Bildung des N-analogen Alkaloids.

1. Synthese N-analoger Heteroyohimbine

1.1. Synthese und Isomerentrennung

Die blutdrucksenkenden Eigenschaften von Ajmalicin waren schon vor 30 Jahren von KRONEBERG et al. (1956) erkannt worden (vgl. NEUSS 1980). Aufbauend auf den oben beschriebenen Befunden wurde versucht, die Sauerstoff-Stickstoffsubstitution zur präparativen Synthese neuer Heteroyohimbinalkaloide zu nutzen. In dem unten aufgeführten Schema ist der Biosynthese der Ajmalicinisomeren die geplante biomimetische Synthese N-analoger Verbindungen gegenübergestellt.

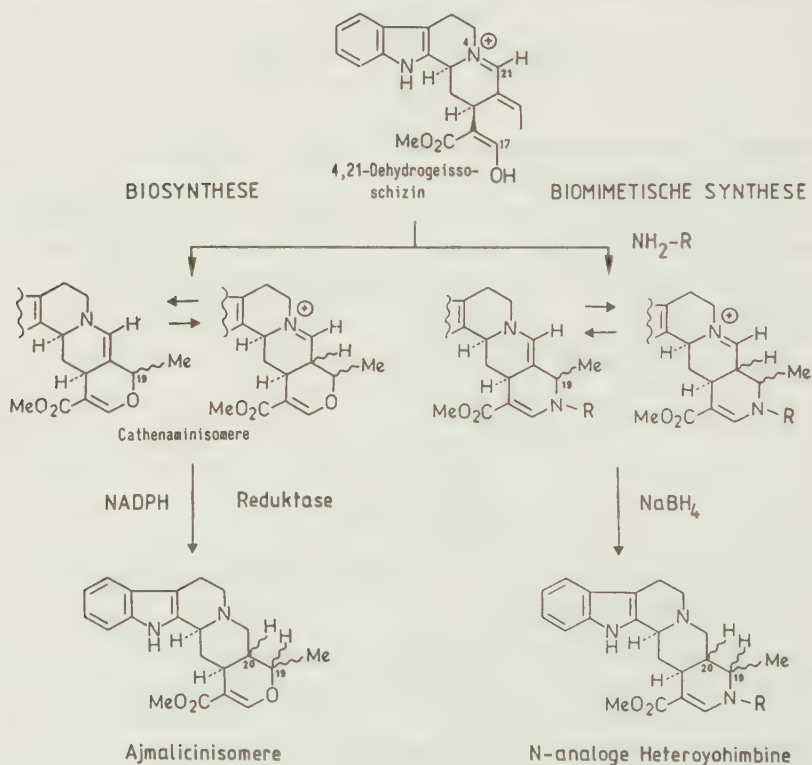


Abb.48 : Gegenüberstellung des Biosyntheseweges der Ajmalicinisomere und der biomimetischen Synthese N-analoger Derivate

100 mg Strictosidin (0.19 mMol) wurden mit 500 mg Tryptaminhydrochlorid (3.1 mMol) in Gegenwart von 3 ml (10 mg Protein) eines Catharanthus roseus Enzymrohextraktes bei 30°C in 0.1 M KPi-Puffer (pH 7.0) inkubiert. Nach 5-stündiger Reaktionsdauer wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, in noch feuchtem Zustand in 5 ml MeOH aufgenommen und während 4 Std. mit 20fachem Überschuß NaBH₄ reduziert. Danach wurde die Reaktionsmischung mit H₂O auf das 10fache Volumen verdünnt und 4 mal mit 50 ml Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Einrotieren der organischen Phase im Vakuum ergaben sich 5 Produkte. Die chromatographische Auftrennung erfolgte im Fließmittelsystem Nr. 13 (siehe Tab. 8).

Substanz	R _f	Ausbeute (%)	MG	λ _{max} (nm)
A	0.86	14	352	290, 280, 225
B	0.77	9	494	291, 284, 223
C	0.72	4	494	291, 284, 223
D	0.58	6	494	291, 284, 223
E	0.46	16	494	291, 284, 223

Tab.8 : Syntheseprodukte der enzymatisch/chemischen Strictosidin-Tryptaminkondensation

1.2. Struktur der Reaktionsprodukte

Durch Einsatz von [5-¹⁴C]Strictosidin (siehe II.6.3.) konnte der Strictosidineinbau in die 5 Reaktionsprodukte sowie die

unter 1.1. gravimetrisch ermittelten Ausbeuten bestätigt werden. Die Synthese wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mg Strictosidin (19 μMol), 50 mg Tryptaminhydrochlorid (0.31 mMol), 2 mg C.roseus Proteinextrakt und 0.1 μMol ^{14}C -Strictosidin (1.3×10^6 dpm) in einem Gesamtvolumen von 5 ml (0.1 M KPi-Puffer, pH 7.0). Die quantitative Auswertung der Syntheseprodukte erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung mit einem Berthold-Dünnschichtscanner.

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, ergaben sich 4 Reaktionsprodukte (B-E) mit gleichem Molekulargewicht und identischen UV-Spektren. Substanz A konnte aufgrund seiner UV- und MS-Daten (siehe HESSE (1979)), sowie der charakteristischen braunen Cersulfatfärbung als Tetrahydroalstonin identifiziert werden.

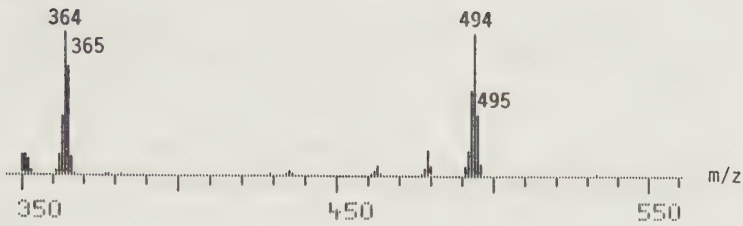
EI-MS m/z (rel.Int.%) : 352 (100), 351 (70), 337 (20), 223 (13), 209 (10), 169 (20), 156 (41).

Bei einer Kondensation der primären Aminogruppe von Tryptamin mit der C-17 Carbonylfunktion des 4,21-Dehydrogeissoschizins ergibt sich nach Wasserabspaltung ein Molekulargewicht von 492. Der ermittelte Wert von 494 m/z (M^+) ist insofern zu erklären, als durch NaBH_4 -Reduktion die Enamin- bzw. Imminiumform (vgl. Abb. 48) in die stabileren reduzierten Derivate überführt wurde. Daß bei dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus nur eine Doppelbindung reduziert wurde, verdeutlicht die NaBD_4 -Reduktion. In Abb. 49 sind die Massenspektren der beiden Reaktionshauptprodukte gegenübergestellt. Das Molekulargewicht ist bei der Reduktion mit NaBD_4 um eine Masseneinheit erhöht.

Das Hauptbruchstück (364 bzw. 365) ergibt sich in beiden Verbindungen durch Abspaltung eines gleich großen Fragments (130 m/z) vom Gesamtmolekül.

Die Fragmentierung erfolgt zwischen den beiden Methylengruppen des Tryptaminsubstituenten infolge des aktivierenden Einflusses des aromatischen Restes. Ähnlich wie bei HESSE et al. (1984) für Benzylspaltungen beschrieben, erfährt das

(Na BH₄-Produkt)



(Na BD₄-Produkt)

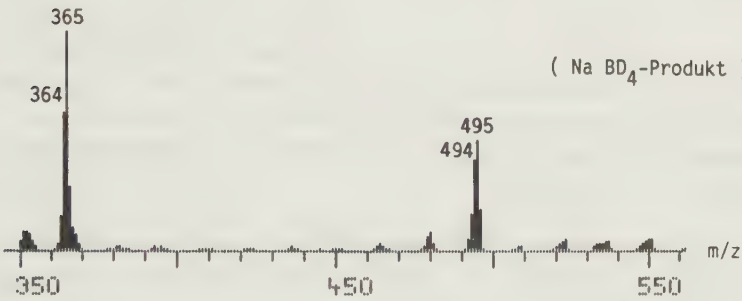


Abb.49 : Vergleich der Massenspektren der Strictosidin-Tryptamin-kondensationsprodukte bei NaBH₄- und NaBD₄-Reduktion

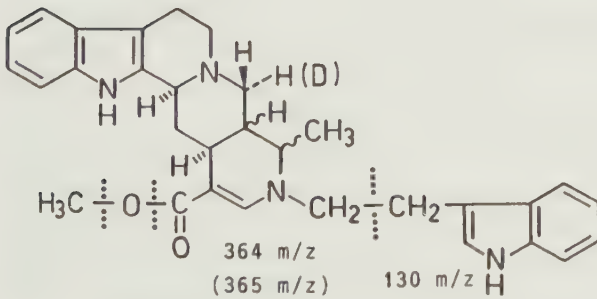


Abb.50 : Hauptfragmente der N-analogen Heteroyohimbine

fragmentierte Indolylmethylkation eine Mesomeriestabilisierung:

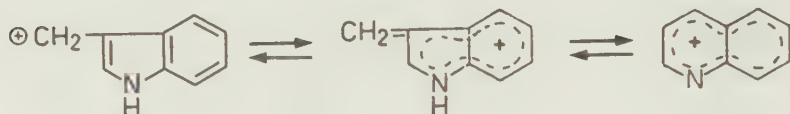


Abb.51 : Mesomeriestabilisierung des Indolylmethyl-Kations

Die durch Reduktion entstandenen zwei neuen Asymmetriezentren (C-19 und C-20) erklären das Auftreten von $2^2=4$ Stereoisomeren. Zur Absicherung der postulierten Struktur wurde eine NMR-spektroskopische Untersuchung des Reaktionshauptproduktes vorgenommen.

In Abb. 52 sind 2 alternative Strukturvorschläge angegeben, die dem Molekulargewicht des postulierten Reaktionsproduktes entsprechen.

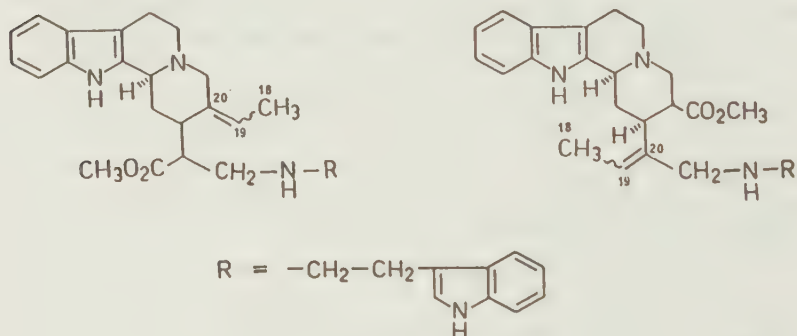


Abb.52 : Theoretische Alternativen zum Strictosidin-Tryptamin-kondensationsprodukt

C-20 ist bei beiden Möglichkeiten ein quartäres C-Atom. Das Signal von H-19 würde deshalb jeweils ein Quartett ergeben.

Abb. 53 gibt das ^1H -NMR-Spektrum in Pyridin- D_5 der Hauptkomponente (E-494) wieder (vgl. Tab. 8). Im Vergleich zum Tetrahydroalstoninspektrum (THA) sind 2 N-H Signale bei ca. 12ppm erkennbar.

Zur einfachen Zuordnung der entscheidenden Signale von H-C18, H-C19 und H-C20 wurde ein zweidimensionales COSY-experiment durchgeführt. Abb. 54 zeigt die Konturdarstellung des COSY-Spektrums von THA im Bereich von 1 bis 4.8ppm. Zur besseren Veranschaulichung ist darüber das eindimensionale Spektrum gezeichnet.

Da die C-18-Methylgruppe (Dublett bei 1.4ppm) nur mit H-19 eine Kopplung zeigen kann, wird durch den in der Abbildung markierten crosspeak sofort die Zuordnung von H-19 (4.6ppm) ermöglicht. Ein weiterer crosspeak verdeutlicht, daß H-19 mit einem Signal bei 1.6ppm (H-20) ebenfalls eine Kopplung aufweist. Damit sind die Resonanzlagen von H-C18, H-C19 und H-C20 mit Sicherheit zugeordnet. Die Ergebnisse stimmen mit NMR-Literaturdaten für Tetrahydroalstonin überein (WENKERT et al. 1982).

In Substanz E-494 (s.o.) erfährt das H-19 Signal (4.2ppm) durch H-18 eine Aufspaltung von 6.5 Hz. H-19 zeigt eine 11-Hz Kopplung mit H-20. Darüberhinaus ist bei Signal H-20 neben der großen Kopplungskonstante (12 Hz von H-19) noch eine kleine Aufspaltung (1-2 Hz) durch H-21 bzw. H-15 zu registrieren. Entscheidend ist, daß H-20 somit nur eine große Kopplung (von H-19) erfährt. Diese Resultate schließen damit eine Struktur mit geöffnetem E-Ring (Abb. 52) aus. In Übereinstimmung mit einem Vergleich der NMR-Spektren verschiedener Ajmalicinisomeren (HÖFLE et al. 1980) ergibt sich für das untersuchte Hauptprodukt der biomimetischen Reaktion die in Abb. 55 angegebene Struktur.

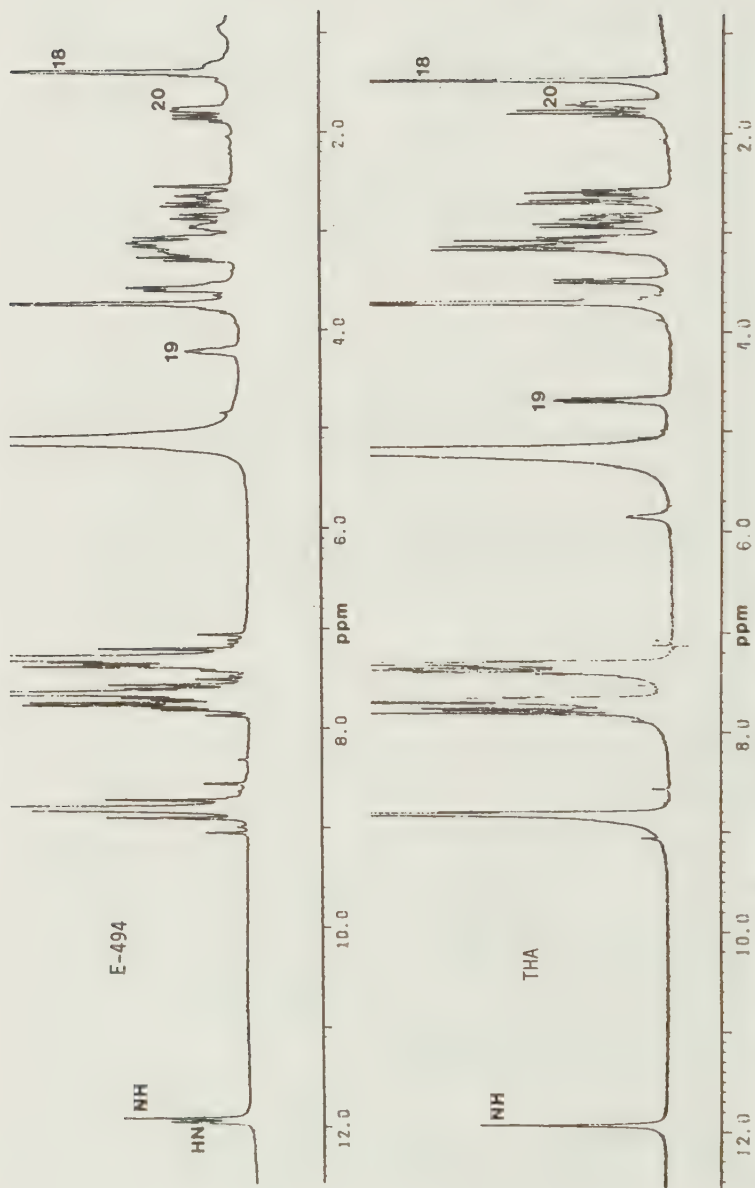


Abb. 53: ^1H -NMR-Spektrum (in Pyridin- D_5) von E-494 (Hauptprodukt der Strictosidin-Tryptaminkondensation) und THA (Tetrahydroalstonin) (360 MHz)

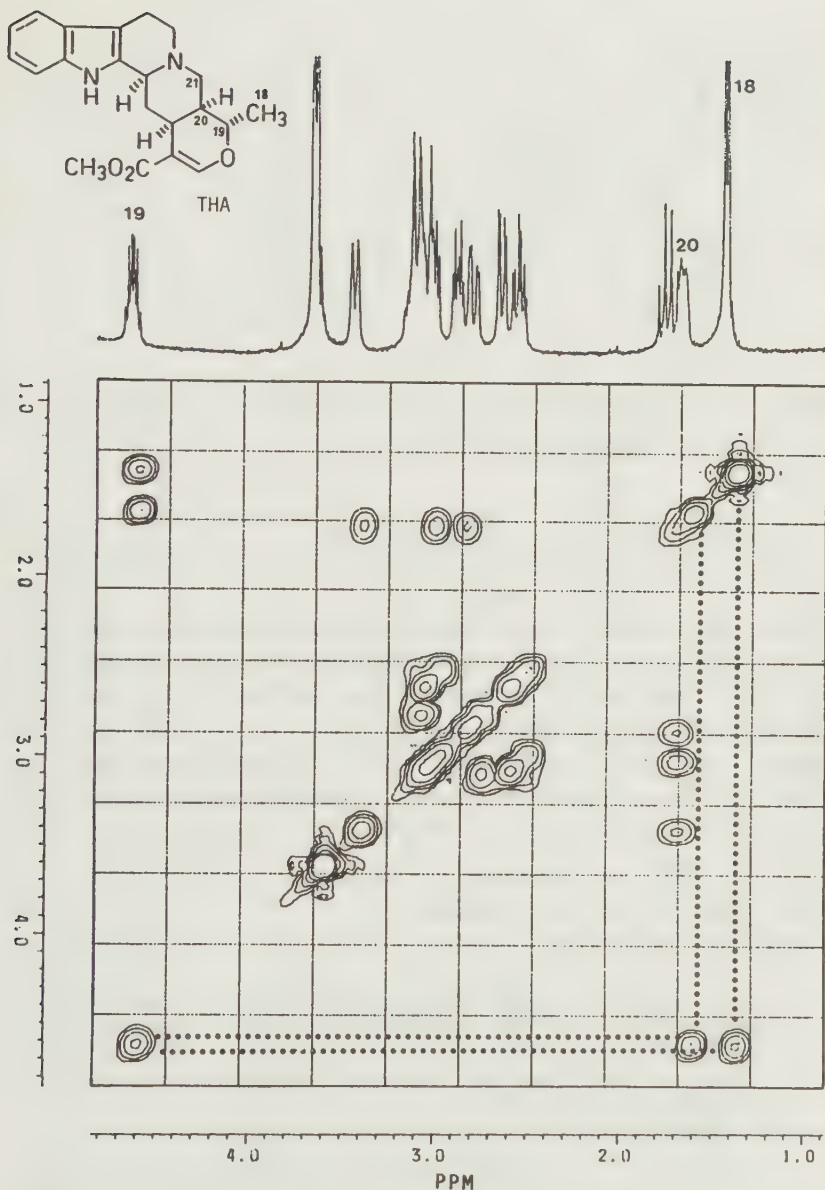


Abb.54 : 2D-COSY-Spektrum von Tetrahydroalstonin (THA)
(Pyridin- D_5 , 360 MHz)

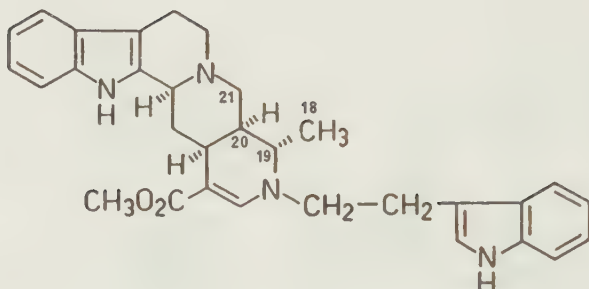


Abb.55 : Struktur der Hauptkomponente der biomimetischen Strictosidin-Tryptamin-Kondensation

1.3. Allgemeine Anwendbarkeit der biomimetischen Aminkondensation

Analog dem in Abb. 48 angegebenen Reaktionsschema wurde die enzymatisch/chemische Aminkondensation mit 9 verschiedenen Aminen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Tryptaminanellierung, wie in C.1.1. erläutert, gewählt. Abb. 56 illustriert die Variationsmöglichkeiten dieser Synthese. Ausgehend von Strictosidin gelang es, die aufgeführten Substanzen nach dem beschriebenen Verfahren zu synthetisieren.

EI-MS Daten der Syntheseprodukte :

EI-MS m/z (rel.Int.%):

- S 1 : 499 (M^+ , 48), 498 (23), 484 (7), 468 (3), 343 (37), 313 (35), 300 (39), 250 (59), 249 (56), 221 (41), 197 (37), 185 (70), 184 (100), 183 (96).
- S 2 : 478 (M^+ , 5), 463 (2), 448 (8), 418 (5), 334 (30), 279 (83), 278 (58), 236 (27), 185 (60), 184 (62), 171 (100), 128 (81).
- S 3 : 471 (M^+ , 44), 470 (28), 456 (9), 440 (2), 364 (67), 350 (17), 332 (8), 272 (25), 248 (21), 221 (39), 197 (72), 185 (55), 166 (67), 121 (100), 107 (12).
- S 4 : 494 (M^+ , 56), 493 (25), 479 (9), 463 (6), 365 (31), 364 (100), 295 (12), 197 (18), 166 (24), 144 (75), 130 (38).

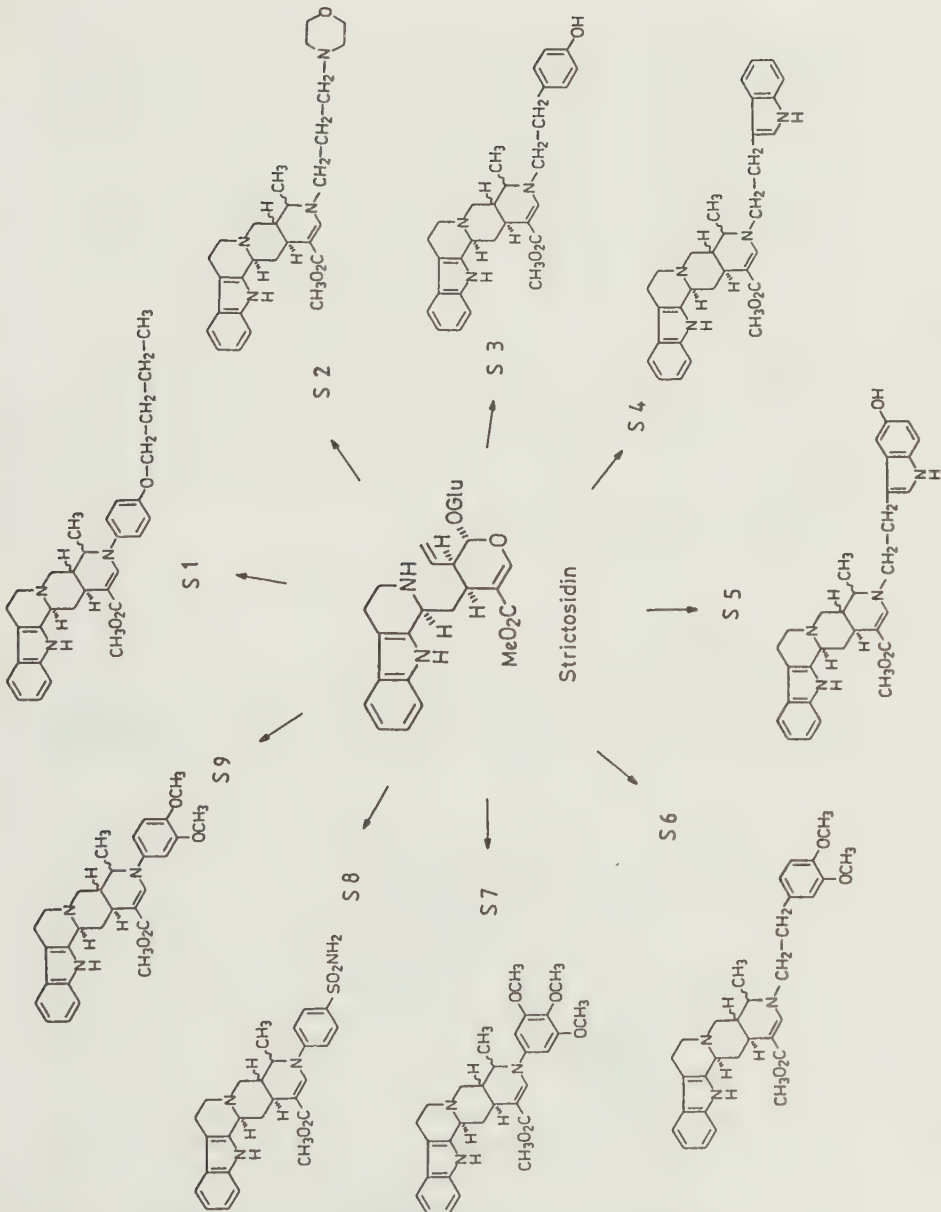


Abb.56 : Strictosidin als Ausgangsverbindung neuer N-analoger
Heteroyohimbinalkaloide

S 5	:	510 (M^+ , 21), 508 (30), 493 (38), 412 (17), 364 (33), 311 (50), 221 (21), 160 (100).
S 6	:	515 (M^+ , 29), 500 (6), 364 (41), 221 (35), 197 (41), 165 (100), 151 (41).
S 7	:	517 (M^+ , 7), 361 (5), 318 (11), 259 (20), 185 (49), 184 (100), 171 (33), 156 (35).
S 8	:	506 (M^+ , 7), 350 (4), 310 (11), 185 (81), 184 (100), 171 (48), 169 (52), 156 (70).
S 9	:	487 (M^+ , 33), 486 (15), 472 (6), 357 (11), 343 (11), 331 (18), 288 (44), 243 (41), 185 (48), 184 (100), 183 (74), 171 (44), 156 (48).

Angegeben sind jeweils die Werte der Synthesehauptprodukte. Für die anderen Isomeren ergab sich das gleiche Molekulargewicht. In Übereinstimmung mit Literaturdaten für verschiedene Ajmalicinisomere (HESSE 1979) waren auch bei den hier synthetisierten Verbindungen entsprechende charakteristische Intensitätsunterschiede zu verzeichnen.

2. Nacyclinsynthese aus Strictosidin

2.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die enzymkatalysierte Entglucosidierung des Strictosidins hatte stets den Ringschluß zwischen N-4 und C-21 zur Folge.

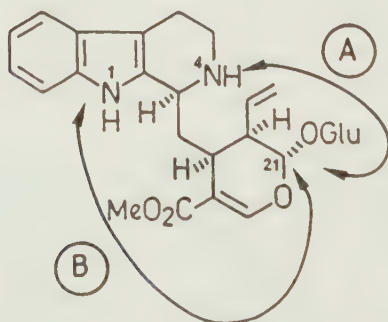


Abb.57 : Verschiedene Cyclisierungsmöglichkeiten des Strictosidins

Durch diesen Reaktionsverlauf (A in Abb.57) war die Synthese von Heteroyohimbinderivaten erreicht worden. Eine weitere Möglichkeit besteht aber auch in der Verknüpfung des Indolstickstoffes (N1) mit C-21 (B in Abb. 57). Verwirklicht ist diese Cyclisierung im Nacyclin, einem Alkaloid, das erstmals die Arbeitsgruppe um BROWN als Strictosidinderivat erwähnte (BROWN et al. 1975) (Abb. 58).

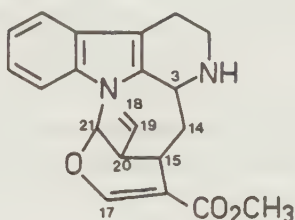


Abb.58 : Struktur des Nacyclins

Die von BROWN beschriebene Reaktion nahm 5 Tage in Anspruch und bei den gewählten Bedingungen (methanolische HCl) konnte Nacyclin nur in Spuren detektiert werden.

Strictosidin stellt heute keinen limitierenden Faktor für biomimetische Synthesen dar (vgl. B.1.,A.3.). Die Nacyclin-synthese sollte deshalb optimiert werden, sowie die bisher nur oberflächlich beschriebene Struktur des Reaktionsproduktes spektroskopisch abgesichert werden.

100 mg Strictosidin (0.19 mMol) wurden mit 4 ml 2 N H_2SO_4 in eine Pasteurpipette eingeschmolzen. Der Reaktionsansatz wird dann für eine Stunde im Trockenschrank ($110^{\circ}C$) belassen. Nach dem Abkühlen erfolgt die Neutralisation des Ansatzes mit 5 N KOH und 10%iger Sodalösung. Durch Essigesterextraktion erhält man ein Reaktionshauptprodukt mit einer charakteristisch gelbgrünen Cer-Färbung ($R_f = 0.80$ FMS 3, $R_f = 0.60$ FMS 6). Die angegebenen Reaktionsparameter (1 Std. bei $110^{\circ}C$) ergaben die höchsten Ausbeuten von 40%.

2.2. Spektroskopische Identifizierung

Die Substanz zeigt folgende spektroskopische Werte:

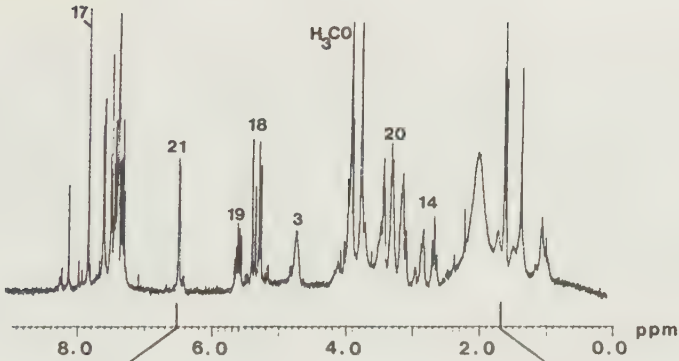
UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 270, 228 nm
EI-MS m/z (rel.Int.%) : 350 (M^+ , 16), 322 (25), 307 (5),
291 (7), 263 (9), 249 (100), 236
(18), 223 (36), 209 (38).

In Übereinstimmung mit der von BROWN postulierten Struktur entstand bei Acetylierung das Monoacetylderivat. Folglich liegt im Nacyclin eine acetylierbare NH- oder OH-Gruppierung vor.

Eine endgültige Klärung der Identität beider Substanzen erfolgte NMR-spektroskopisch. In Abb. 59 ist das ^1H -NMR-Spektrum des Syntheseproduktes sowie das Ergebnis des 2D-COSY Experiments dargestellt.

H-17 erscheint erwartungsgemäß als scharfes Singulett (Abb. 59 A). Die Nachbarstellung des Sauerstoffatoms sowie einer Doppelbindung bewirkt eine Verschiebung zu tiefem Feld (7.8 ppm). Bei 6.3ppm ist ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 5 Hz registrierbar. Anhand der COSY-Darstellung sowie der Tieffeldverschiebung ist das Signal als H-21 identifizierbar. Der mit Hilfe des zweidimensionalen Spektrums ermittelte Kopplungspartner ist H-20 (3.2ppm). Weitere Kopplungen sind aus Abb. 59 B ersichtlich. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die von BROWN vorgeschlagene Struktur für Nacyclin. Ein weiteres Singulett bei 8ppm deutet darauf hin, daß die Substanz noch mit ca 20% einer isomeren Verbindung verunreinigt ist. Die dünnschichtchromatographische Reinigung (FMS 3, 6, 10) ermöglichte bisher aber keine Abtrennung dieser Nebenkompente.

A



B

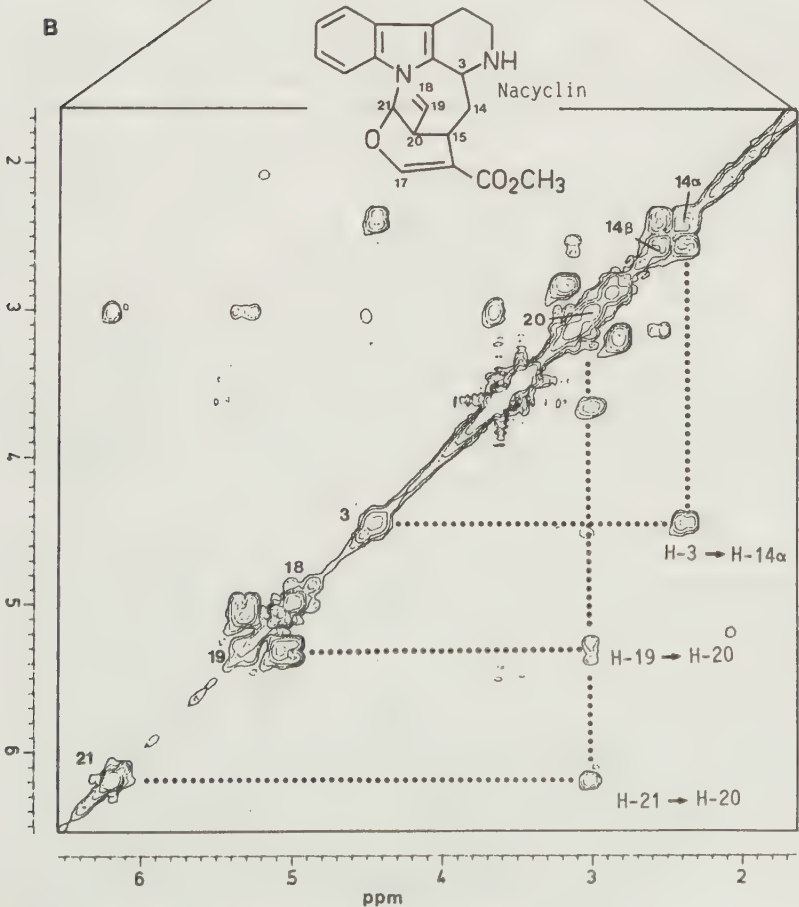


Abb.59 : ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen von Nacyclin

A : 1D- ^1H -NMR-Spektrum

B : 2D-COSY-Spektrum

(CDCl_3 , 360 MHz)

3. Pharmakologische Prüfung

3.1. Einsatz von Rezeptorbindungsstudien

Durch Studien von Rezeptor-Wirkstoff Bindungen wurden erstmals experimentell abgesicherte Aussagen über Rezeptoren ermöglicht. Einen enormen Aufschwung erhielt diese Forschungsrichtung, als zu Beginn der 70er Jahre radioaktiv markierte Liganden verfügbar wurden (vgl. KOROLKOVAS 1974). Radiorezeptortests werden heute eingesetzt um das Bindungsverhalten neuer Substanzen an Rezeptoren zu prüfen.

Die pharmakologischen Untersuchungen wurden von der Firma NATTERMANN (Köln) durchgeführt wie bei ARENS et al. (1982) beschrieben. Als radioaktiv markierte Liganden fanden Verwendung:

- ^3H -Dihydroergocryptin (α -Rezeptor)
- ^3H -Dihydroalprenolol (β -Rezeptor)
- ^3H -Flunitrazepam (Benzodiazepinrezeptor)
- ^3H -Imipramin (Imipraminbindungsstelle)

Die nach dem in C.1.1. beschriebenen Verfahren synthetisierten N-analogen Heteroyohimbine wurden ohne vorherige Isomerentrennung den Rezeptortests unterzogen. In Tab. 9 ist die prozentuale Verdrängung der radioaktiven Liganden vom Rezeptor durch die entsprechenden Syntheseprodukte angegeben.

Die Resutate lassen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Bindung der getesteten Substanzen an die verwendeten Rezeptorpräparationen erkennen. Keine der getesteten Substanzen zeigte Affinität zum β -Rezeptor. Substanz S 6 hingegen bewirkte bei 10^{-4} molarer Konzentration eine vollständige Verdrängung des Liganden am α -Rezeptor. Bei 100facher Verdünnung (10^{-6}M) wurde noch eine 63%ige Verdrängung ermittelt. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes ergab für die getrennten Isomere Werte zwischen $2,4 \times 10^{-7}\text{M}$ und $4,4 \times 10^{-6}\text{M}$. Diese Ergebnisse liegen in der Größenordnung der Bezugssubstanz Dihydroergocryptin ($3,5 \times 10^{-6}\text{M}$) (IC_{50} -Wert: Konzentration der Substanz, die 50% des Radioliganden aus seiner spezifi-

schen Rezeptorbindung verdrängt). Ebenfalls fast vollständige Verdrängung des Liganden vom α -Rezeptor ist durch Substanz S 10 (Nacyclin) bei 10^{-4} molarer Konzentration zu verzeichnen. Bei dieser Verbindung wurden im Anschluß an

Syntheseprodukte	α -Rezeptor $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l	β -Rezeptor $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l	Benzodiazepin-Rezeptor $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l	Imipramin $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l
S 1	58	0	13	48
S 2	-	5	19	77 / 24
S 3	21	14	22	4
S 4	40	13	18	28
S 5	42	0	26	42
S 6	100 / 63	21	65 / 10	39
S 7	41	30	95 / 50	22
S 8	86 / 36	4	43	-
S 9	47	-	63	4
S 10	98 / 55	60	11	18

Ausgangs - produkt	α -Rezeptor $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l	β -Rezeptor $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l	Imipramin $10^{-4} / 10^{-6}$ Mol/l
AP - S2	17 / 13	23	-
AP - S6	25	12	0
AP - S7	32	16	4
AP - S8	31	15	0

Tab.9 : Prozentuale Verdrängung spezifischer Liganden vom Rezeptor durch Syntheseprodukte S 1- S 10 sowie verschiedener Ausgangsprodukte (AP = jeweiliges primäres Amin).

das Rezeptorbindungs-Vorscreening in vivo Untersuchungen durchgeführt. Interessant hierbei war vor allem die Fragestellung, ob die nach den Rezeptortestergebnissen vermutbare Herz-Kreislauf Wirkung im Tierversuch bestätigt werden konnte.

3.2. In vivo Testergebnis

Die Untersuchungen auf Blutdruck- sowie Herzfrequenzveränderungen durch Nacyclin wurden an Ratten durchgeführt. Die Dosierung des Alkaloids betrug 10 mg/kg Körpergewicht. Für das eingesetzte Nacyclin wurden die nachstehenden Werte registriert:

a) Veränderung des Blutdrucks

nach 15 Minuten	- 10,4 mm Hg
nach 30 "	- 12,6 "
nach 45 "	- 26,2 "
nach 60 "	- 33,1 "

b) Herzfrequenzänderung

nach 15 Minuten	+ 11,7 Schläge/min.
nach 30 "	+ 3,8 "
nach 45 "	- 19,2 "
nach 60 "	- 37,3 "

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Rezeptortestresultaten; sie sind also in diesem Fall auf das in vivo System übertragbar.

4. Raucaffricin als Ausgangsverbindung für chemische und enzymatische Strukturmodifikationen

4.1. Zugang zu neuen Sarpagan-Alkaloiden

1983 entdeckten PFITZNER und STÖCKIGT ein pflanzliches Enzym, das eine Umwandlung von Sarpagan- zu Ajmalan-Alkaloiden katalysierte (PFITZNER und STÖCKIGT 1983 a). Die aus R.serpentina isolierte Vinorinsynthase ermöglichte die Acetylcoenzym-A-abhängige Synthese des Ajamlinvorläufers Vinorin.

In Abb. 60 A ist dieser entscheidende Schritt der Ajmalinbiosynthese dargestellt. Abb. 60 B hingegen verdeutlicht die Umkehrung dieser Reaktionsfolge. In diesem Fall ermöglicht die chemische Abspaltung der Estergruppierung die Bildung des instabilen Deacetylraucaffricins mit 17-OH Indoleninstruktur. Verbindungen des 17-Hydroxyindolenintyps konnten bisher weder aus Pflanzenmaterial isoliert noch chemisch synthetisiert werden. Substanzen dieser Alkaloidklasse lagern sich spontan in stabile Sarpaganalkaloide um.

10 mg Raucaffricin (0.019 mMol) wurden in einer Pasteurpipette mit 2 ml 1 N NaOH eingeschmolzen und 20 Min. 100°C ausgesetzt. Nach dem Abkühlen und Neutralisieren der Reaktionsmischung erfolgte die Extraktion mit Essigester. Mit 70%iger Ausbeute wurde ein neues Produkt isoliert ($R_f = 0.33$ in FMS 2, $R_f = 0.25$ in FMS 1). Beim Ansprühen mit Ammoniumsulfat war die für Sarpaganalkaloide typische graue Anfärbung zu beobachten. Mit dem Sprühreagenz auf Zucker (siehe II.4.1.) wurde der glucosidische Charakter der Verbindung nachgewiesen. Dem UV-Spektrum war zu entnehmen, daß das gebildete Hauptprodukt keiner Indoleninstruktur mehr entsprach (Abb.61). Dem hierfür typischen Absorptionsmaximum von 258 nm des Raucaffricins stand ein Wert von 274 nm des Reaktionsprodukts gegenüber. Diese UV-Daten bestätigten die Umwandlung des Indolenin- in das Indolsystem.

Zur massenspektroskopischen Identifizierung wurden ca. 10 µg Substanz im MS-Tiegel über Nacht acetyliert (siehe II.6.2.) und anschließend vermessen. Es ergab sich nachstehende Fragmentierung:

EI-MS m/z (rel.Int.%): 638 (M^+ , 2), 610 (2), 609 (1), 499 (3),
409 (3), 351 (3), 331 (4), 307 (5),
291 (7), 246 (7), 183 (5), 169 (86),
168 (14), 108 (100).

Das Molekulargewicht von 638 entspricht dem Tetraacetat der in Abb. 60 B postulierten Struktur des Sarpaganglucosids.

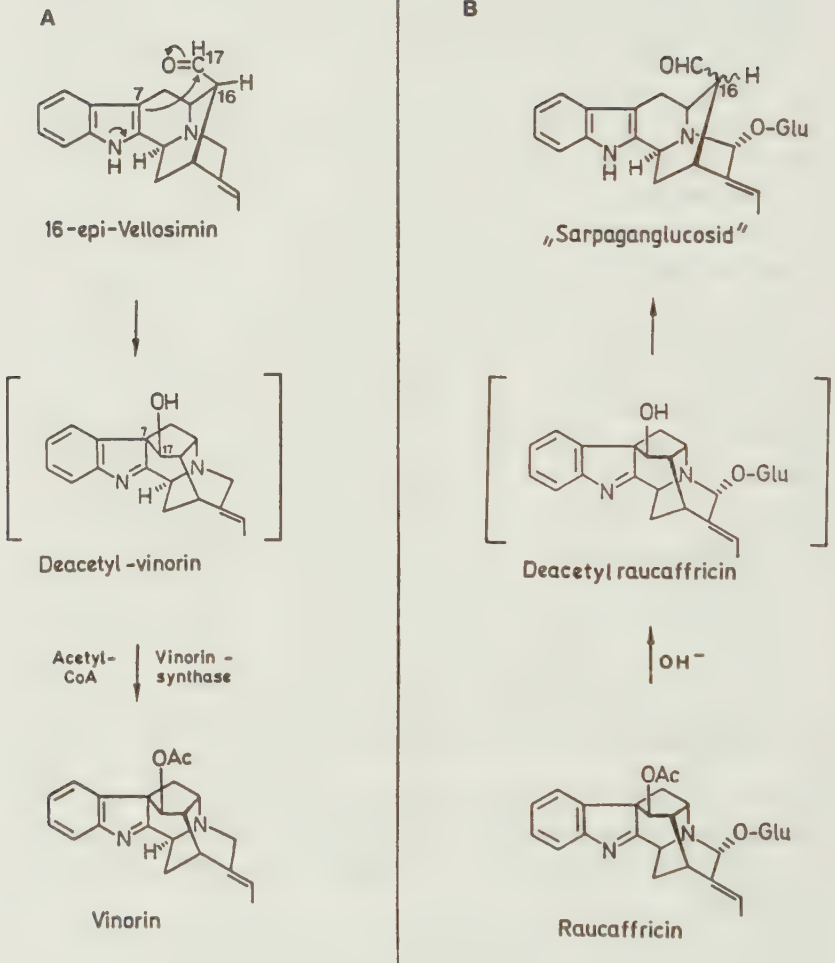


Abb.60 A : Biosynthetische Umwandlung von Sarpagan- in Ajmalan-alkaloide, nach PFITZNER und STÖCKIGT (1983)

Abb.60 B : Chemische Überführung von Ajmalan- in Sarpaganglucoside

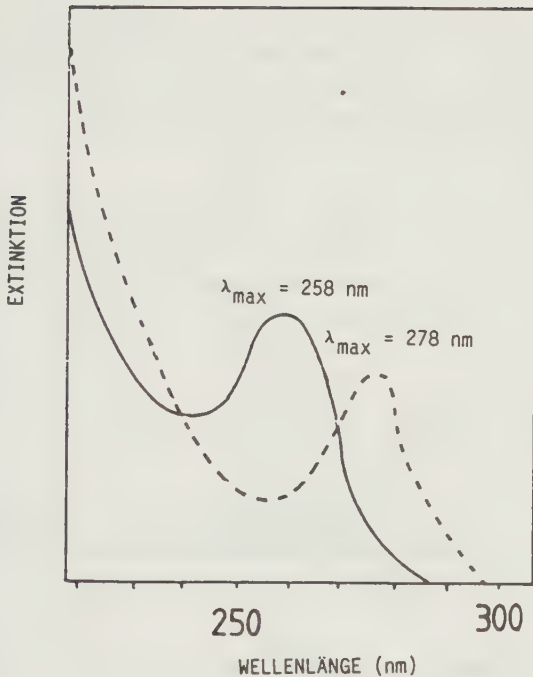


Abb.61 : Vergleich der UV-Spektren des synthetisierten Sarpagan-glucosids (---) und Raucaffricin (in MeOH) (—)

Eine sauer katalysierte, analog durchgeführte Ringöffnung mit 1 N H_2SO_4 ergab ein Produkt des gleichen Molekulargewichts jedoch mit geringfügig unterschiedlichen Intensitäten der Fragmentationen. Aus der Literatur bekannte pH-abhängige Umwandlungen von exo- in endo-Aldehyde der Sarpaganreihe (VAN TAMELEN et al. 1970) lassen auf die Bildung zweier Aldehydformen schließen. Die Strukturzuordnung dieser beiden Isomeren erfolgte NMR-spektroskopisch. Nach SAKAI et al. (1980) erscheint das Signal des Aldehydprotons für die "endo-Form" bei ca. 9.1ppm. Bei einer exo-Stellung der Aldehydfunktion ist nach PFITZNER und STÖCKIGT (1983 b) die Resonanzlinie bei ca. 9.7ppm zu erwarten. Die exakte Stereochemie an C-16 (siehe Abb. 60B) muß deshalb eine noch durchzuführende NMR-spektroskopische Untersuchung klären. Eine weitere

Reaktionsmöglichkeit, zugleich auch Absicherung der neuen Sarpaganglucosidstruktur, stellte die NaBH_4 -Reduktion des Produkts dar. Nach standardmäßig durchgeführter Reduktion (II.6.1.) und anschließender Acetylierung (II.6.2.) wurde folgendes Produkt erhalten:

EI-MS m/z (rel.Int.%): 682 (M^+ ,1), 351 (10), 335 (6), 170 (14), 169 (80), 156 (10), 108 (100).

Die Verbindung stellt das Pentaacetat des reduzierten Sarpaganglucosids dar. Die Reaktionsfolge läßt sich wie folgt zusammenfassen:

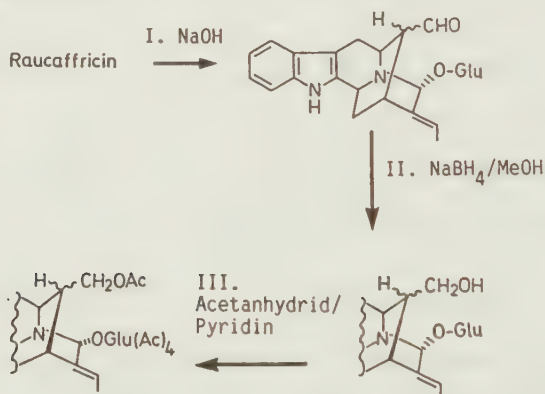


Abb.62 : Chemische Umwandlung des Raucaffricins in Sarpaganglucoside

Durch Einsatz des neuen Pflanzenenzym Sarpaganglucosidase können die entsprechenden Aglyca in Freiheit gesetzt werden. Im Hinblick auf weitere biomimetische Synthesen (Kondensation mit Aminen), erscheint hier vor allem das Sarpaganalkaloid mit Aldehydstruktur interessant.

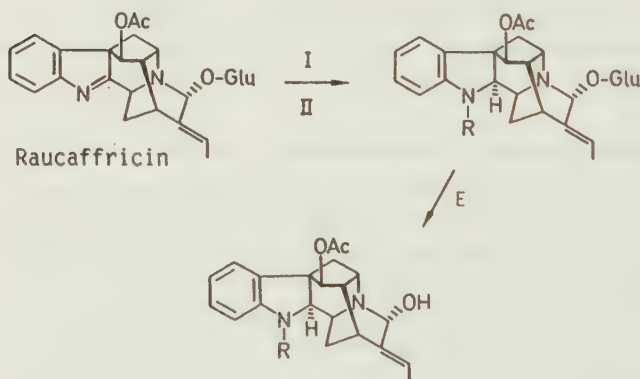
2 mg (4.3 μMol) der Substanz (MG 470) wurden mit 5 mg eines gefriergetrockneten Proteinextraktes (0.2 mg Protein/mg Lyophilisat) von R. serpentina 60 Minuten bei 30°C in 3 ml H_2O inkubiert. Dünnschichtchromatographisch konnte danach kein Glucosid mehr detektiert werden. Das entstandene Aglycon (R_f 0.20 in FMS 3) zeigt das in Abb. 63 wiedergegebene Massenspektrum.

te auffällige orange Anfärbung erkennbar ($R_f = 0.25$ FMS 6). Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 289 und 240 nm, damit ebenfalls deutliche Unterschiede zu Raucaffricin (vgl. Abb. 61). Nach enzymatischer Entglucosidierung wie in C.4.1. beschrieben, wies das Aglycon folgende MS-Daten auf:

EI-MS m/z (rel.Int.%): 352 (M^+ , 23), 297 (9), 222 (20), 185 (100), 184 (34), 169 (36), 168 (50), 143 (28), 131 (49), 130 (53).

Die Verbindung entspricht somit dem 1,2-Dihydrovomilenin (Abb. 64).

Von DANIELI et al. (1984) wurde bei der Partialsynthese des Aspidosperma Alkaloids Vindolin die Reduktion einer Indolenindoppelbindung bei gleichzeitiger N-Methylierung beschrieben. Entsprechend dieser Vorschrift ergab die zusätzliche Anwesenheit von Formaldehyd (1 ml, 35%ig) bei sonst unveränderten Reaktionsbedingungen 87 mg (85%) der entsprechenden N-methylierten Verbindung (Abb. 64).



- I : NaCNBH_3 , KPi/Citratpuffer (1M, pH 5.0), $\text{R}=\text{H}$
 II : NaCNBH_3 , KPi/Citratpuffer (1M, pH 5.0), CH_2O , $\text{R}=\text{CH}_3$
 E : Raucaffricinglucosidase

Abb.64 : Chemische Derivatisierung der Indoleninstruktur in Raucaffricin und anschließender Freisetzung des Aglycons

Zur Abspaltung des Acetylrestes wurden 30 mg 1,2-Dihydroraucaffricin (58 μ Mol) in 2 ml 10 N KOH gelöst. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur ergaben sich nach Chromatographie in FMS 7 ($R_f=0.2$) 15 mg des entacetylierten Produkts (55%). Das EI-MS des Aglycons zeigte folgende Daten:

EI-MS m/z (rel.Int.%): 310 (M^+ , 23), 185 (100), 184 (20), 180 (55), 169 (38), 168 (58), 159 (27), 156 (23), 144 (32), 143 (44), 131 (61), 130 (64).

Die Entacetylierung des Tetrahydroderivates wurde entsprechend durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde ebenfalls als Aglycon identifiziert.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 312 (M^+ , 33), 185 (56), 183 (36), 182 (61), 169 (44), 168 (53), 161 (34), 144 (49), 143 (93), 130 (100).

Abb. 65 faßt die durchgeführte Derivatisierung von 1,2-Dihydroraucaffricin zusammen.

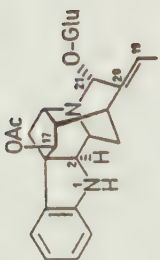
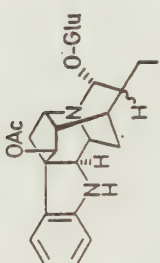
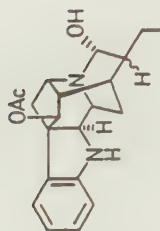
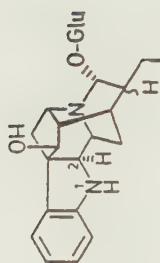
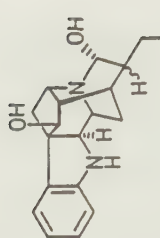
Das $N_{(\alpha)}$ -Methyl-1,2-dihydrovomilenin zeigt nachstehendes Fragmentierungsmuster:

EI-MS m/z (rel.Int.%): 366 (29), 222 (15), 199 (78), 198 (29), 183 (25), 182 (47), 181 (21), 170 (21), 157 (43), 145 (70), 144 (100), 131 (37).

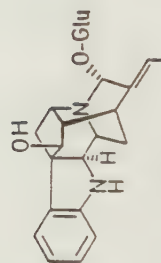
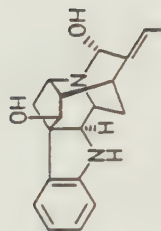
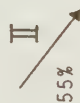
80 mg 1,2-Dihydroraucaffricin (156 μ Mol) wurden in 2 ml MeOH unter Zugabe von 1 ml 2 N HCl und 20 mg 10% Pd-C gelöst. Nach 20-stündiger Reaktion unter H_2 -Atmosphäre und nachfolgender dünnenschichtchromatographischer Reinigung (FMS 7 $R_f=0.3$) erhält man 42 mg 1,2,19,20-Tetrahydroraucaffricin.

Die Substanz wurde nach enzymatischer Zuckerabspaltung massenspektrometrisch identifiziert.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 354 (M^+ , 28), 295 (11), 185 (62), 184 (29), 169 (33), 168 (54), 167 (32), 163 (32), 156 (24), 143 (100), 131 (77), 130 (83).



1,2-Dihydro-raucaffricin



- I. 10 % Pd/C, H₂
- II. 10 N KOH
- E. Raucaffricinglucosidase

Abb.65 : Chemisch/enzymatische Strukturmodifikationen durchgeföhrt am 1,2-Dihydro-raucaffricin

4.3. NMR-spektroskopische Bestimmung der Stereochemie der Reduktionsprodukte

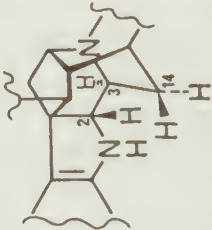
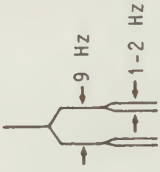
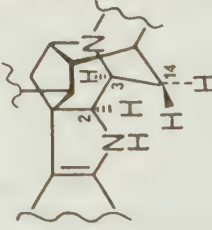
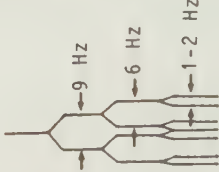
In Abb. 65 wurde die Stereochemie von H-2 als α -ständig postuliert. Diese Zuordnung basiert auf massenspektrometrischen Ergebnissen. Eine zweifelsfreie Klärung mußte eine NMR-spektroskopische Untersuchung ergeben.

Im Verlauf der Biosynthese der Ajmalinalkaloide wird H-2 stereoselektiv von der Moleküloberseite in die 2B Position eingeführt. Abb. 66 gibt diese, sowie als mögliche Alternative der chemischen Reduktion, die 2 α Stellung an.

Die aus dem Dreidingmodell entnommenen Bindungswinkel erlauben eine Vorhersage der zu erwartenden Signalmultiplizitäten. H-3 muß im Fall einer H-2B Stellung eine große Kopplung durch H-14 α sowie eine sehr kleine Signalaufspaltung von H-14 β erfahren. Für die Signalform bedeutet dies ein doppeltes Dublett ($J_1 = 8-9$ Hz, $J_2 = 1-2$ Hz). Befindet sich H-2 in α -Position, so sollte sich ein komplexeres Signal ergeben aufgrund der in Abb. 66 angegebenen Diederwinkel. Ursache hierfür sind 3 Aufspaltungen. Die Kopplungskonstanten ($J_1 = 8-9$ Hz, $J_2 = 1-2$ Hz, $J_3 = 5-6$ Hz) entsprechen den Werten der Karplusgleichung (GÜNTHER 1983). Die ^1H -NMR-Spektren von Ajmalin und Norajmalin zeigen für H-3 erwartungsgemäß jeweils ein Dublett mit der Kopplungskonstanten $J = 9$ Hz. Dieser Wert bestätigt das Vorliegen der H-2B Position in beiden Alkaloiden. Beim chemisch synthetisierten 1,2-Dihydrraucaffricin (siehe 4.2.) war neben einer großen Kopplung ($J_1 = 9$ Hz) eindeutig eine mittlere Kopplungskonstante ($J_2 = 5.5$ Hz) zu registrieren. In Abb. 67 A ist das ^1H -NMR-Spektrum von 1,2-Dihydrraucaffricin in Pyridin- D_5 wiedergegeben.

Die Signalzuordnungen ließen sich mit dem ebenfalls abgebildeten COSY-Spektrum absichern (Abb. 67B). Zusätzlich wurde in einem Doppelresonanzexperiment die Kopplung von H-2 auf H-3 eliminiert. Nach dem Einstrahlen bei 4.1ppm (H-2) konnte bei 4.65ppm (H-3) nur noch ein Dublett mit der Kopplungskonstante von 9 Hz beobachtet werden (siehe Abb. 68). Damit ist bewiesen, daß die Kopplung von H-3 mit H-2 5.5 Hz

Abb.66 : Vergleich der Bindungswinkel der H-2 α und der H-2 β Form am Ajmalingerüst und der daraus resultierenden Kopplungskonstanten

	H-3 - H-2	H-3 - H-14 α	H-3 - H-14 β	zu erwartende Signalform für H-3
 2B	Diederwinkel 90° <u>keine</u> Kopplung	Diederwinkel 10° große Kopplung 9 Hz	Diederwinkel 110° kleine Kopplung 1-2 Hz	
 2A	Diederwinkel 60° Kopplung 5-6 Hz	Diederwinkel 10° große Kopplung 9 Hz	Diederwinkel 110° kleine Kopplung 1-2 Hz	

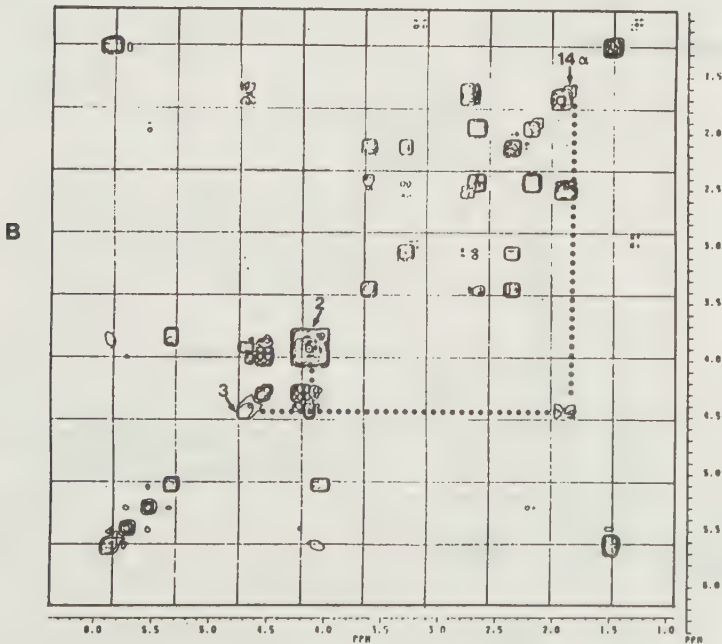
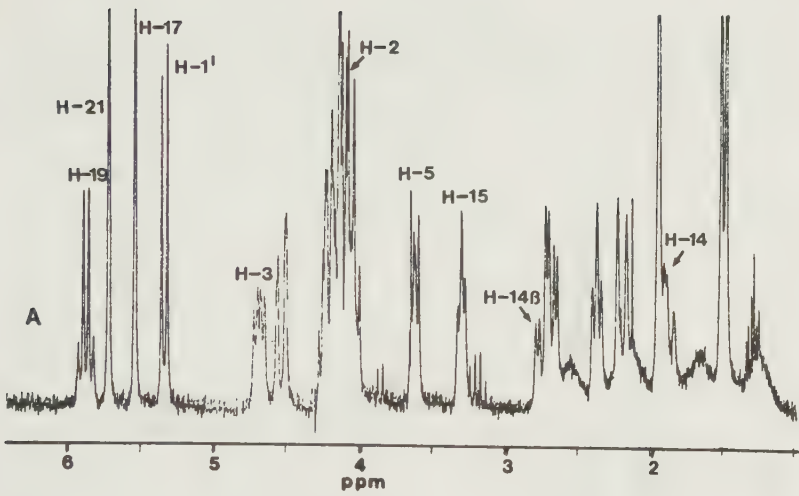
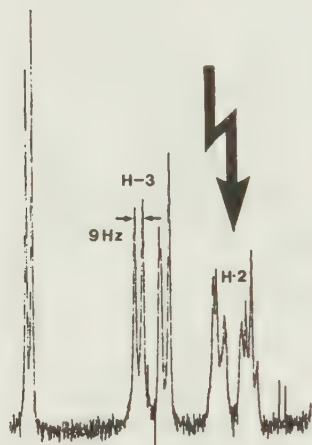


Abb.67 : ^1H -NMR-Spektren von 1,2-Dihydroraucaffricin
 A : 1D- ^1H -NMR-Spektrum, B : 2D-COSY-Spektrum
 (Pyridin- D_5 , 200 MHz)

beträgt. Das durch chemische Reduktion erhaltene 1,2-Dihydro-raucaffricin entspricht somit der in dieser Form in der Natur nicht vorkommenden 2 α -(R)-Konfiguration.

Das hier vorgestellte Syntheseprinzip erlaubt somit die Darstellung einer Reihe neuer Alkaloide, deren pharmakologische Aktivität in Zukunft noch geprüft werden muß.



B : Doppelresonanzexperiment
(Einstrahlstelle: 4.1ppm, H-2)



A : Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums
(vor dem Einstrahlen)

Abb.68 : Doppelresonanz-Experiment zur Bestimmung der Kopplungskonstanten im 1,2-Dihydroucaffricin

5. Vomilenin als Synthesearbeitsgangprodukt

5.1. Spektroskopische Daten von Vomilenin

Die spektroskopische Untersuchung des präparativ hergestellten Vomilenins (vgl. B.2.5.) ergab:

UV $\lambda_{\max}$: 257, 218 nm
 EI-MS m/z (rel.Int.%) : 350 (M^+ , 11), 307 (5), 291 (6), 183 (13), 182 (10), 181 (7), 169 (100), 168 (32), 167 (14), 156 (9).

In Abb. 69 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Vomilenin in Pyridin- D_5 dargestellt.

Das aus Raucaffricin enzymatisch dargestellte, sowie das aus *R.serpentina* Zellkulturen isolierte Vomilenin zeigten identische NMR-Spektren. Im Gegensatz zum Raucaffricin (vgl. A.2.1.4.) ist im Spektrum des Aglycons eine Dublizität der Resonanzlinien von H-18 (ca. 1.6 ppm) und H-19 (ca. 6 ppm) erkennbar. Mit Hilfe des COSY-Spektrums (Abb. 70) erfolgte die Zuordnung der jeweiligen Kopplungspartner.

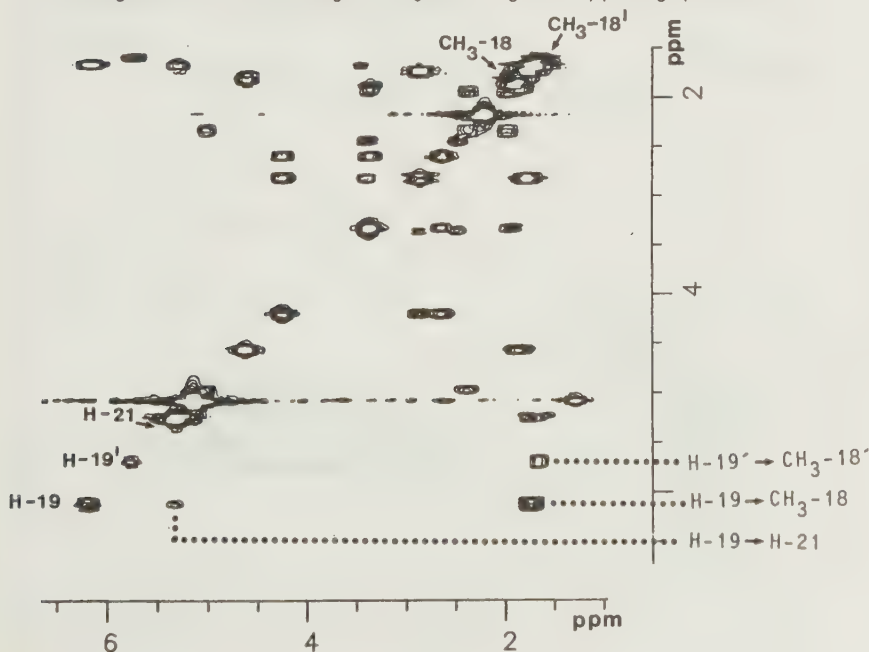


Abb.70 : 2D-COSY-Spektrum von Vomilenin
 (Pyridin- D_5 , 300 MHz)

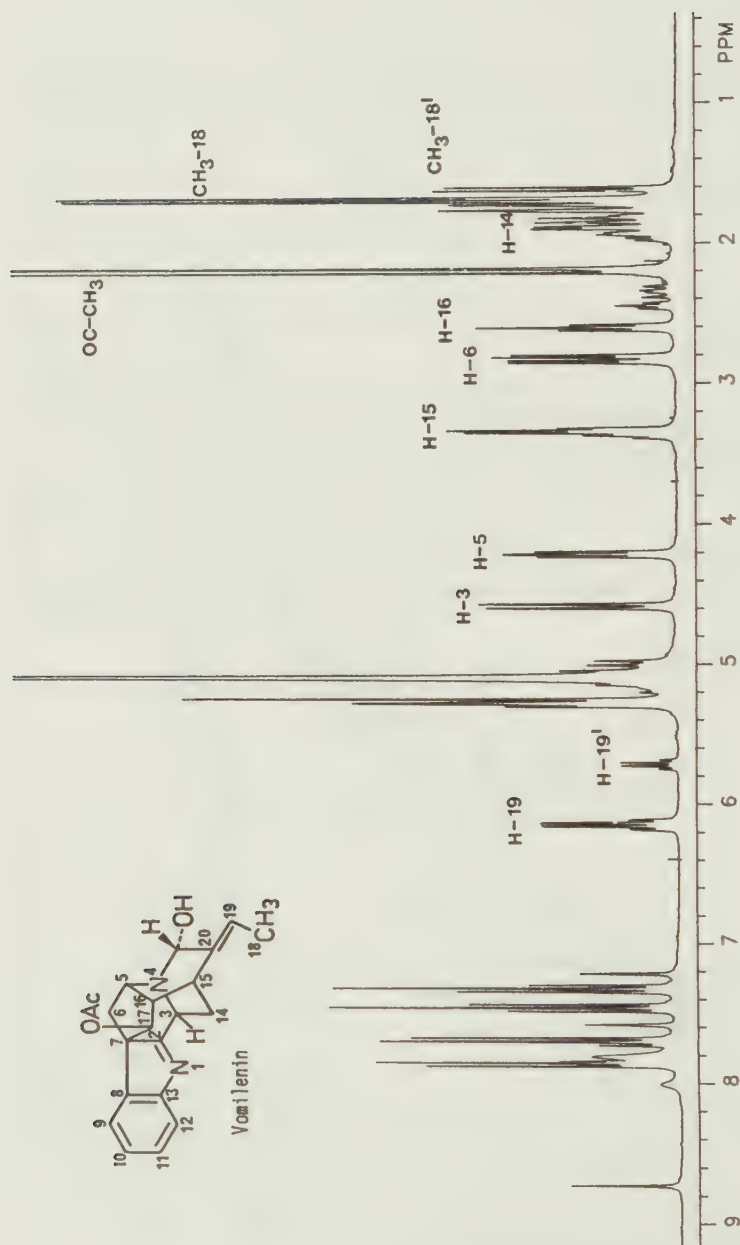
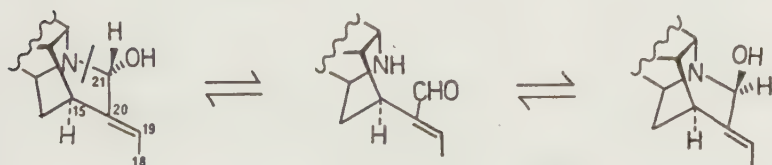


Abb. 69 : ^1H -NMR-Spektrum von Vomilenin (Pyridin-D_5 , 300 MHz)

Erwartungsgemäß zeigt der crosspeak von H-19 und H-18 die spin-spin Kopplung beider Signale an. Ein weiterer crosspeak indiziert eine Kopplung zwischen H-19 und H-21. Im Konturplot ist darüberhinaus jedoch auch ein crosspeak für die Resonanzen H-19' und H-18' registrierbar. Die verbleibenden Signale sind in Übereinstimmung mit dem IndoleninGrundgerüst des Raucaffricins. Infolge der O-glucosidischen Bindung ist im Raucaffricin der D-Ring des Moleküls fixiert. Das Glucoalkaloid liegt also ausschließlich in der 21-R Konfiguration vor. Das Aglycon Vomilenin hingegen besitzt eine reaktive Carbinolaminstruktur. Diese kann sich, wie auch Literaturdaten für andere Verbindungen zeigen, über eine Aldehyd-Zwischenstufe im Gleichgewicht mit einer zweiten isomeren Form befinden (VAN BEEK et al. 1985).



Diederwinkel zwischen

38° ← H-21 und H-19 → 70°

175° ← H-15 und H-19 → 175°

Abb.71 : Isomerisierung des Vomilenins in Lösung

(Die Diederwinkel wurden am Dreidingmodell ermittelt)

Durch Integration der Signale von H-19 und H-19' wurde ein Isomerenverhältnis von 3.4:1 ermittelt (siehe Abb. 72).

Vermessen der Probe in DMSO-D₆ statt Pyridin-D₅ bestätigte dieses Verhältnis. Nur bei den Resonanzlinien der Hauptkomponente (21-S) dieser Mischung war eine Feinaufspaltung zu registrieren (vgl. Abb. 72). Ursache hierfür muß eine allylische Kopplung zwischen H-21 und H-19 sein. In Einklang hiermit wird aus dem COSY-Experiment (Abb. 70) klar ersichtlich, daß nur bei der Hauptkomponente ein crosspeak, damit auch eine Aufspaltung von H-19 mit H-21 existiert. Bei allylischen Kopplungen treten minimale Werte bei Diederwin-

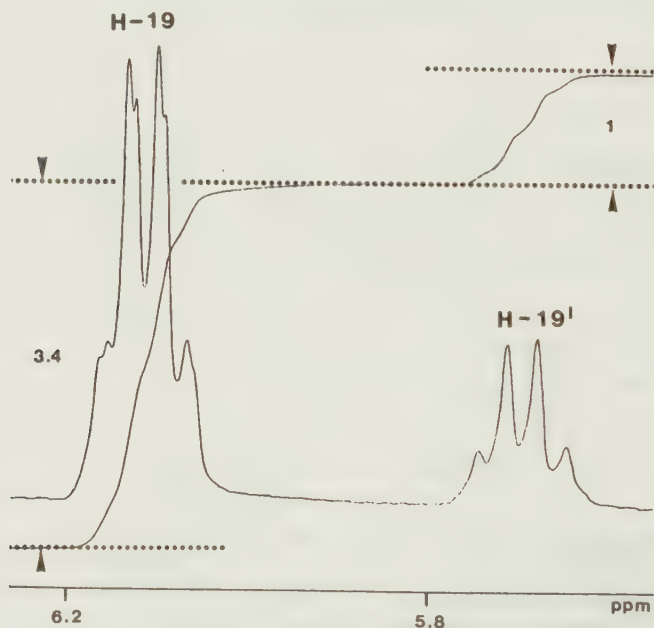


Abb.72 : Ermittlung des Isomerenverhältnisses durch Integration (Deutlich erkennbar ist in der Abbildung auch die Feinaufspaltung des Signals des Hauptproduktes)

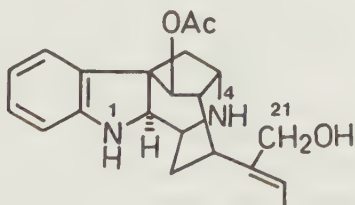
keln von 0 und 180° auf (GÜNTHER 1983). Bei beiden isomeren Formen kann damit eine Kopplung mit H-15 ausgeschlossen werden (Diederwinkel 175°). Für die 21-S Form hingegen ist eine allylische Aufspaltung durch H-19 von 1.5 - 2Hz zu erwarten. Abgeleitet aus diesen Daten liegt das Hauptprodukt des Vomilenins in Lösung in der 21-S Konfiguration vor.

Durch Acetylierung des Vomilenins (siehe II.6.2.) ist das 21-O-Acetylderivat in 82%iger Ausbeute zugänglich.

EI-MS m/z (rel.Int.%) : 392 (M⁺,38), 350 (13), 349 (17), 334 (18), 291 (28), 273 (48), 211 (29), 183 (27), 169 (100), 168 (59).

UV λ_{max} : 250, 217 nm

Versetzt man Vomilenin in MeOH mit einem Überschuß NaCNBH₃, so entsteht nach 20-minütiger Reaktion im Eisbad als Hauptprodukt folgendes Derivat:



EI-MS m/z (rel.Int.%) : 354 (M⁺,34), 341 (3), 311 (3), 295 (7), 224 (14), 185 (17), 169 (19), 168 (32), 143 (100), 151 (75), 130 (93).

Nach Acetylierung der Verbindung ergibt sich das 1,4,21-Triacetat, damit auch der Beweis des geöffneten D-Ringes.

EI-MS m/z (rel.Int.%) : 480 (M⁺,3), 438 (20), 396 (11), 354 ((8), 337 (10), 319 (9), 266 (11), 224 (19), 185 (14), 169 (21), 168 (34), 143 (44), 130 (100).

5.2. Umlagerung von Vomilenin in Perakin

Schon 1962 wurde die Reaktivität des Vomilenins beschrieben (TAYLOR et al. 1962). Die Autoren folgerten, daß ein ähnlich strukturiertes Indoleninalkaloid, Perakin, bei sauren Aufarbeitungsbedingungen aus Vomilenin entstehen könnte.

Diese Umlagerungsreaktion bot sich an, um auch im präparativen Maßstab an Perakin zu gelangen. Damit stünde aufgrund der Aldehydfunktion im Perakin ein interessantes Ausgangsmolekül für anschließende Derivatisierungen zur Verfügung.

200 mg Vomilenin (0.57 mMol) werden 20 Minuten in 1.5 ml Eisessig unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird im Vakuum zur Trockne eingedampft, 5 ml H₂O zugesetzt und mit 5%iger Sodalösung auf pH 7.5 eingestellt. Nach Extraktion mit Dichlormethan erhält man in 90%iger Ausbeute 180 mg Perakin (FMS 9 R_f = 0.46).

UV $\lambda_{\max}$: 257, 220 nm
EI-MS m/z (rel.Int.%) : 350 (M⁺, 42), 321 (11), 251 (16),
221 (13), 196 (33), 169 (77), 168
(100), 167 (41), 140 (15), 130 (11),
129 (17), 128 (16).

Auffällig im Vergleich zum Massenspektrum des Vomilenins sind die umgekehrten Intensitätsverhältnisse der peaks 168/169. Auch ist die Aldehydfunktion aus dem MS deutlich ersichtlich durch das Fragment mit der Masse 321 (M⁺ -29 m/z).

5.2.1. NMR-spektroskopische Untersuchung der Perakinstruktur

Auch im Fall des Perakins mußten NMR-spektroskopische Experimente die exakte Stereochemie der Asymmetriezentren C-19 und C-20 klären. Abb. 73 gibt das ¹H-NMR Spektrum von Perakin in Pyridin-D₅ wieder.

Die Position der C-18 Methylgruppe wurde in einem NOE-(Nuclear Overhauser Effect) Experiment bestimmt (zur Probenvorbereitung siehe II.5.2.).

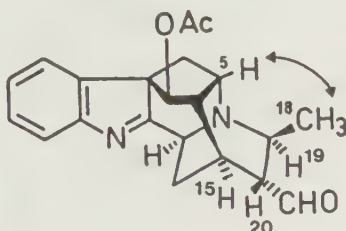


Abb.74 : Zu erwartender NOE-Effekt im Perakin zwischen CH₃(18) und H-5

Nach Einstrahlung der Methylgruppe (1.3ppm) war bei 10 aufeinanderfolgenden Messungen eine mittlere Intensitätszunahme des H-5 Signals (3.6ppm) von 19% zu verzeichnen. Als interner Standard wurden die beim Einstrahlen unveränderten Integrale der aromatischen Protonen herangezogen. Das Ergebnis bestätigt die räumliche Nähe der Methylgruppe und H-5 im Perakinmolekül. Damit ist gleichzeitig die α -Stellung von H-19 festgelegt. Die Stereochemie am C-20 wurde durch ein Doppelresonanzexperiment bewiesen. Einstrahlungen der Resonanzfrequenz von H-15 (Triplett bei 2.8ppm) bewirkt keine Veränderung der Resonanzlinie von H-20 (Dublett bei 2.1ppm). Dies ist in Übereinstimmung mit einem Diederwinkel von 85° zwischen H-15 und H-20 im Falle einer β -Stellung von H-20. Einstrahlungsexperimente der Resonanzfrequenz von H-19 und H-20 zeigten eindeutig, daß die beobachtete Aufspaltung von H-20 (9.2 Hz) durch eine Kopplung mit H-19 verursacht wird. Das Resultat bestätigt die in Abb. 74 angegebene Struktur des Perakins sowie die Ergebnisse von LIBOT et al. (1980).

5.2.2. Chemische Perakinreduktion

Die in B.3. beschriebene enzymatische Perakinreduktion ermöglicht die Synthese von Raucaffrinolin. Im folgenden Kapitel werden nun auf chemischem Wege weitere Reduktionsprodukte beschrieben.

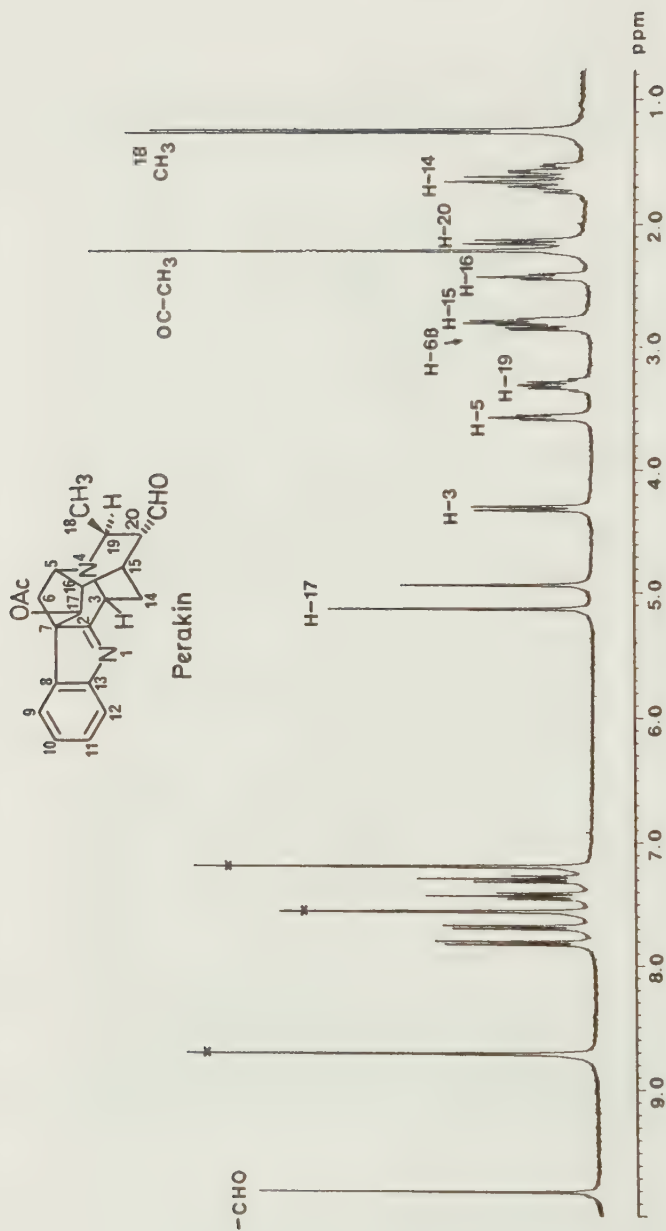


Abb.73 : ¹H-NMR-Spektrum von Perakin in Pyridin-D₅ (360 MHz)

Versetzt man 10 mg Perakin (29 μMol) in 5 ml MeOH mit einem Überschuß NaBH_4 (ca. 80 mg) so ergeben sich nach drei Stunden Reaktionszeit 4 neue Produkte (Tab. 10). Die dünnschicht-chromatographische Auftrennung erfolgte in FMS 2.

Produkt	R_f	Ausbeute (%)	MG	λ_{max} (nm)
A	0.30	10	352	260, 222
B	0.20	20	312	289, 272, 221
C	0.15	10	354	289, 240
D	0.10	40	312	289, 272, 223

Tab.10 : Chemische Reduktionsprodukte von Perakin

Eine selektive Umsetzung des Perakins zum 1,2-Dihydoraucaffrinolin wird durch Reduktion in schwach saurem Milieu ermöglicht. Bei Einsatz von NaCNBH_3 in 1M KPi-Citrat-Puffer (pH 4) entsteht in 82%iger Ausbeute Produkt C (Abb. 75).

UV λ_{max} (log ϵ) 289 (3.03), 240 (3.46) nm.

Andererseits kann auf der Perakinstufe auch die präparative Umwandlung des Ajmalangerüsts in ein Sarpaganderivat erfolgen. Unter alkalischen Bedingungen bei NaBH_4 -Überschuß in MeOH wird die 17-O-Acetylgruppe abgespalten. Das intermediäre instabile 17-Hydroxy-indoleninderivat lagert sich spontan unter Ringöffnung in ein Sarpaganalkaloid um. Die entstandene Aldehydgruppierung in Position 17 wird ebenso wie die Formylgruppe an C-20 zum primären Alkohol reduziert. Die Reaktion gelingt in 79%iger Ausbeute (vgl. B/D Abb. 75).

UV λ_{max} (log ϵ): 289 (3.25), 272 (3.34), 223 (4.03) nm

Die anschließenden Acetylierungen (Abb. 75) erfolgten quantitativ.

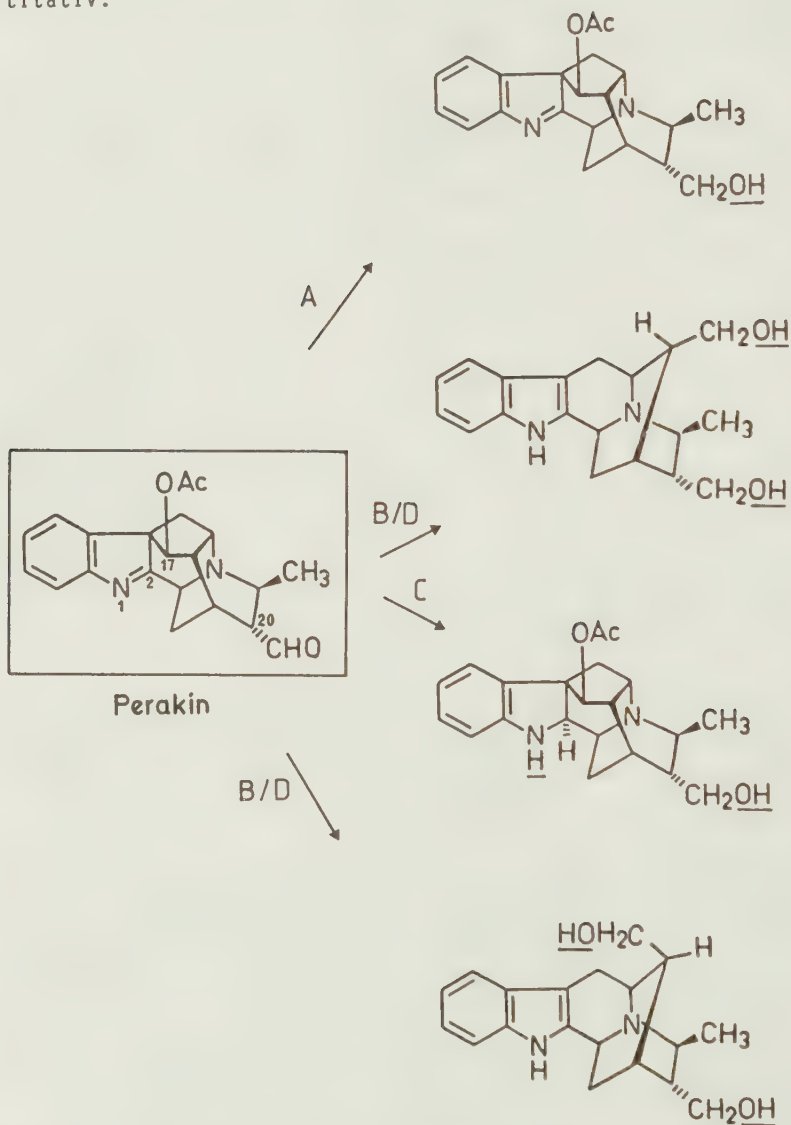


Abb.75 : Chemisch erhaltene Reduktionsprodukte aus Perakin (markiert sind jeweils die acetylierbaren Gruppen)

5.2.3. Aldehyd-Aminkondensation am Perakinmolekül

Die schon mehrfach erwähnte Aldehyd-Aminverknüpfung kann auch im Fall des Perakins wie folgt angewandt werden.

5 mg Perakin (14 μMol) und 2.3 mg Tryptamin (14 μMol) werden in 1 ml Eisessig 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen, Zugabe von 4 ml Wasser und Neutralisation erfolgt die Ethylacetatextraktion des Reaktionsgemisches. Folgendes Reaktionsprodukt wurde in 74%iger Ausbeute erhalten:

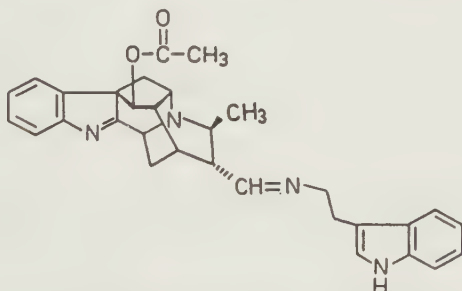


Abb.76 : Chemisch dargestelltes Perakin-Tryptamin-Kondensationsprodukt

EI-MS m/z (rel.Int.%): 492 (M^+ , 1), 322 (4), 296 (1), 211 (3)
196 (2), 172 (25), 171 (100), 170 (26),
154 (5), 144 (6).

Alkalische Hydrolyse des Perakins mit 5 N KOH ermöglicht die Abspaltung des 17-O-Acetylrests und damit den Zugang zu einer neuen Dialdehydstruktur (Abb. 77).

EI-MS m/z (rel.Int.%): 308 (M^+ , 30), 280 (19), 279 (38), 265 (7), 252 (9), 251 (14), 237 (19), 209 (33), 169 (100), 168 (81).

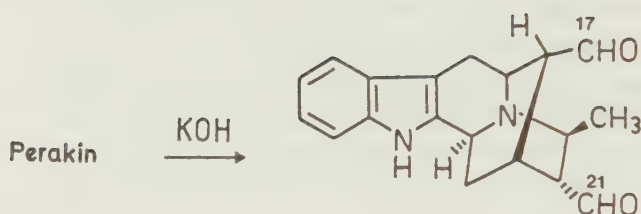


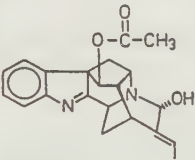
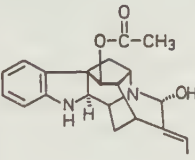
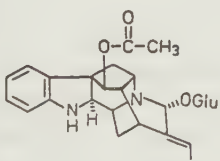
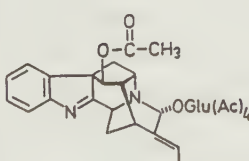
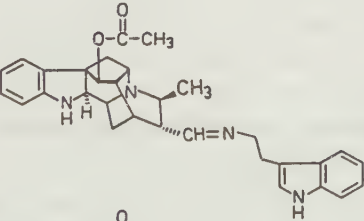
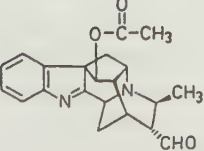
Abb.77 : Sarpagandialdehyd-Struktur durch alkalische Perakinhydrolyse

Diese Verbindung erlaubt die Kondensation primärer Amine an 2 verschiedenen Positionen im Molekül (C-17, C-21).

6. Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudien

Folgende aus Raucaffricin partialsynthetisch hergestellte Alkaloide des Ajmalintyps wurden im pharmakologischen Vorscreening untersucht. Die Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudien sind in Tab. 11 zusammengefaßt (vgl. C.3.1.).

Tab. 11 läßt erkennen, daß glycosidische Derivate, auch in acetylierter Form, nur geringe Affinität zum Rezeptor aufweisen; ebenso Verbindungen mit Indolenin- oder Aldehydfunktionen. Reduktion zum Dihydroindol oder Freisetzung des Aglycons führte zu deutlich erhöhtem Bindungsverhalten am Rezeptor.

	REZEPTORBINDUNG ($10^{-4}/10^{-6}$)		
	β -REZEPTOR	α -REZEPTOR	Imipramin
	6	26	0
	5	76/46	9
	18	40	3
	21	21	0
	54	56/24	49
	2	9	0

Tab.11 : Prozentuale Verdrängung spezifischer Liganden vom Rezeptor
(bei 10^{-4} bzw. 10^{-6} molarer Konzentration)

A N H A N G

In vivo NMR-Experimente

In der vorliegenden Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie in erster Linie zur Strukturaufklärung isolierter und partial-synthetisch hergestellter Alkaloide eingesetzt. Ein weiteres reizvolles Anwendungsgebiet der NMR-Technik stellen in vivo NMR-Untersuchungen dar. 1975 gelang es SCHAEFER et al. den Metabolismus in Sojabohnen durch $^{13}\text{C}_2$ -Einbau NMR-spektroskopisch zu studieren (siehe Übersichtsartikel von ROBERTS 1984). Relativ neu sind in vivo NMR-spektroskopische Experimente mit pflanzlichen Zellkulturen. 1983 wurde von WRAY et al. erstmals eine ^{31}P -NMR-Untersuchung von Nicotiana tabacum Zellkulturen durchgeführt. Die Registrierung von ^{31}P -Resonanzlinien ermöglicht physiologische Prozesse in den Zellen zu verfolgen, wie z.B. die ATP/ADP-Umwandlung.

1. Voraussetzungen für in vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen von R.serpentina Zellen

Es sollte untersucht werden, ob mit Zellkulturen von R.serpentina ebenfalls in vivo NMR-Messungen durchführbar sind. Als Meßmethode wurde die ^{13}C -NMR Spektroskopie ausgewählt. Ein Vorversuch mußte zunächst klären, ob es prinzipiell möglich sei, ^{13}C -NMR Spektren von R.serpentina Zellen mit akzeptabler Signalbreite zu erhalten. Abb. 78 zeigt das ^{13}C -NMR Spektrum von R.serpentina Zellen. 4 g frisches Zellmaterial wurden aus LS-Medium (5 Tage gewachsen) im 10 mm-Röhrchen mit einer Handzentrifuge (ca. 2000 Upm) vorsichtig abzentrifugiert. Nach Zugabe von 0.5 ml D_2O sowie 5 mg $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ (85% angereichert) erfolgte die Messung.

Die registrierte Linienbreite, gemessen an der Basis des ^{13}C -Acetatsignals, beträgt ca. 4ppm. Der Vermessung von $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ im Medium ohne Pflanzenzellen ergab keine Verschärfung der ^{13}C -Resonanzlinien. Die beobachtete Signalverbreitung müßte deshalb auf der Zusammensetzung der benutzten Nährlösung beruhen.

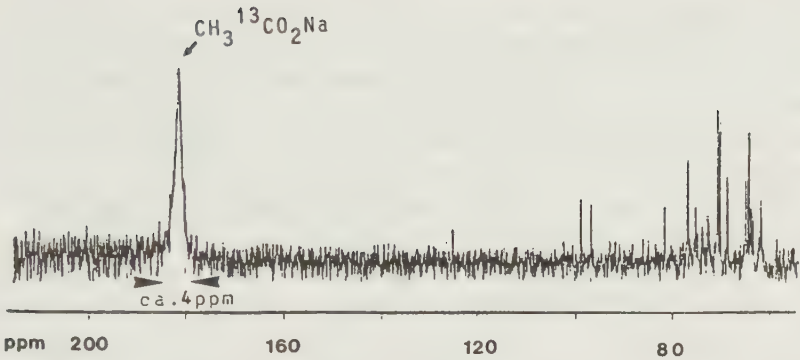


Abb.78 : ^{13}C -NMR-Spektrum von R. serpentina-Zellen im Nährmedium (200 MHz)

1- ^{13}C -Acetat wurde deshalb in einem Minimalmedium vermessen. Diese Nährlösung zeichnet sich durch die Abwesenheit paramagnetischer Salze aus (siehe II.1.2.). Aus Abb. 79 ist ersichtlich, daß unter diesen Bedingungen Resonanzlinien mit einer für ^{13}C -Spektren üblichen Signalbreite erhalten werden können.

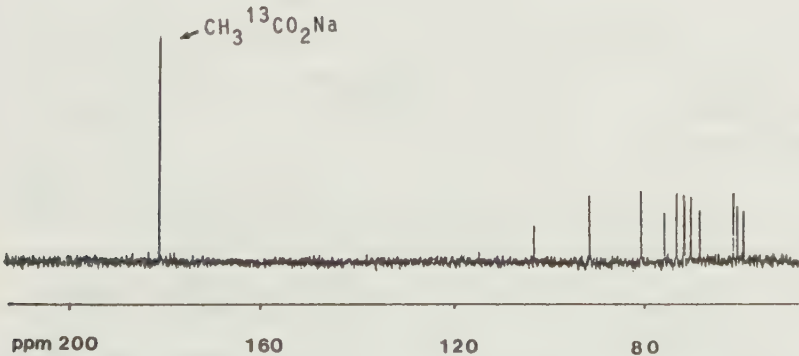


Abb.79 : ^{13}C -NMR-Spektrum von $\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ in Minimalmedium (200 MHz)

2 g R.serpentina Zellen wurden nach 5 Tagen Wachstum im LS-Medium in das Minimalmedium überführt. Nach weiteren 10 Tagen erfolgte die Aufnahme des Spektrums. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Abb. 80 läßt eine Anhäufung von Signalen mit akzeptabler Linienbreite im Bereich zwischen 60 und 100ppm erkennen, sodaß im Prinzip die Voraussetzungen für in vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen mit R.serpentina Zellen gegeben sind.

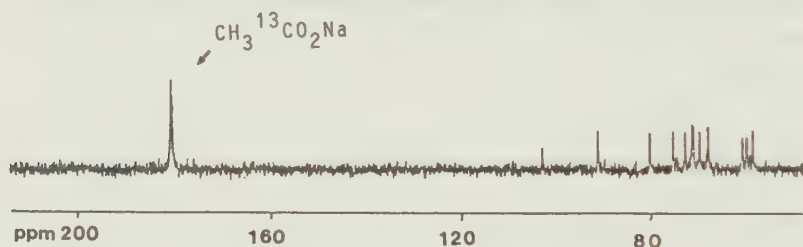


Abb.80 : ^{13}C -NMR-Spektrum von R. serpentina -Zellen in Minimalmedium (200 MHz)

2. Fütterungsversuche mit [5- ^{13}C]Strictosidin

In einem in vitro Vorversuch wurde zunächst die enzymatische Bildung von [5- ^{13}C]Strictosidin aus Secologanin und [1'- ^{13}C]Tryptamin verfolgt. Damit sollte die Zuordnung von C-5 erreicht werden.

Das Inkubationsvolumen betrug 3 ml (50 mM KPi-Puffer, pH 7.0). Die Reaktion wurde im 10 mm NMR-Röhrchen durchgeführt und enthielt 10% D_2O , 5 mg [1'- ^{13}C]Tryptamin (31 μMol) in 50 μl MeOH sowie 10 mg Protein eines Catharanthus roseus Rohextraktes. Nach Zugabe von 19.5 mg Secologanin (50 μMol) konnte neben der Abnahme des [1'- ^{13}C]Tryptamin-Signals (40.7ppm) das Ansteigen der Resonanzlinie von [5- ^{13}C]Strictosidin (41.5 ppm) NMR-spektroskopisch verfolgt werden. Als Referenzpeak diente das Methanol-Signal bei 49.5ppm.

Zur Durchführung des Fütterungsversuchs wurden 2 g R.serpentina Zellen aus LS Medium in 12 ml Minimalmedium (siehe II.1.2.) überführt und mit 15 mg [5-¹³C]Strictosidin versetzt. (3 Experimente, Kolben A B C). Als Kontrollwert wurden Zellen verwendet, die nicht mit Strictosidin versetzt wurden. Nach 2 Tagen erfolgte die Abtrennung des Zellmaterials von Kolben A vom Nährmedium und Aufnahme des NMR-Spektrums (Abb. 81 A). Die Zellen wurden anschließend 4 mal mit 10 ml Saccharose-freiem Minimalmedium aufgeschlämmt und abzentrifugiert. In der vierten Waschfraktion waren enzymatisch keine Zucker mehr nachweisbar (vgl. B.2.2.1.). Nach dem durchgeführten Waschvorgang sind deutliche Veränderungen der Signalintensitäten der Zucker-Resonanzlinien zu erkennen (Abb 81 B).

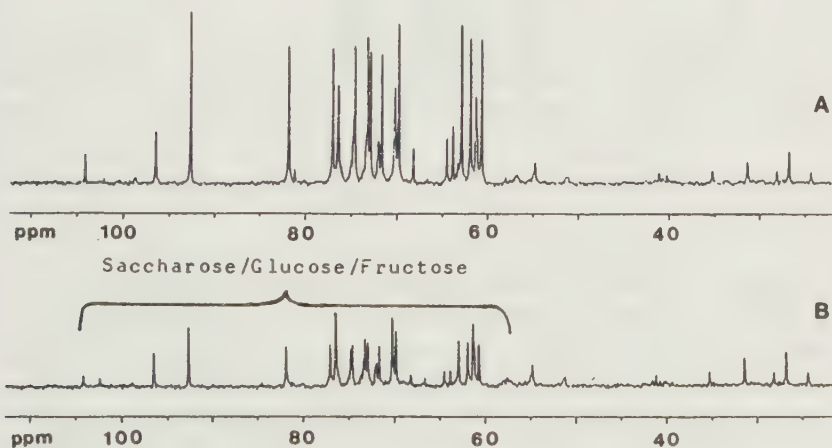


Abb.81 : ¹³C-NMR-Spektren von R. serpentina-Zellen nach 2-tägiger Fütterungszeit mit [5-¹³C]Strictosidin (400 MHz)

A : vor dem Waschen

B : nach dem Waschen

Die Zuordnung der ¹³C-Signale erfolgte durch Vermessung der bei der Raucaffricin-Isolierung präparativ erhaltenen Zucker-komponenten. 15 mg Saccharose (S), 20 mg Glucose (G) und 10 mg Fructose (F) entspricht in der Zusammensetzung dem isolierten Zuckergemisch. Dieses Verhältnis repräsentiert somit

auch annähernd die Zuckerzusammensetzung in der Pflanzenzelle. Abb. 82 zeigt das ^{13}C -NMR Spektrum dieser Zuckermischung. Zur Kalibrierung wurde ein Tropfen DMSO-D_6 hinzugefügt (39.6ppm).

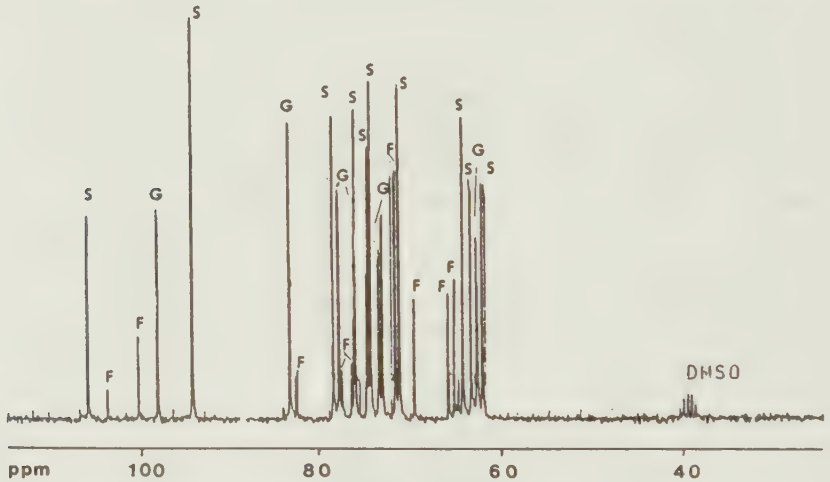


Abb.82 : ^{13}C -NMR-Spektrum eines simulierten Zuckergemisches (200 MHz)

Im Bereich der zu erwartenden Resonanzlinie (ca. 41ppm) des $[5-^{13}\text{C}]$ Strictosidins waren keine Signalintensitätsveränderungen registrierbar. Dies ist in Übereinstimmung mit einer HPLC-chromatographischen Untersuchung des Nährmediums von Kolben A. Sie zeigte, daß nach einer 2-tägigen Inkubationsdauer ca. 80% des markierten Strictosidins noch nicht von den Zellen aufgenommen wurde.

3 g Frischgewicht von Kolben C wurden nach 14-tägiger Fütterungszeit wie oben beschrieben vermessen. Obwohl im jetzt erhaltenen Spektrum neu hinzukommende Signale im Bereich von 30-60ppm zu verzeichnen waren, erlaubte auch die Darstellung eines Subtraktionsspektrums keine eindeutige Resonanzzuordnung. Der Markierungsgrad des reisolierten Raucaffricins wurde massenspektrometrisch (Abb. 83) zu 33% bestimmt (nach HESSE et al. 1984).

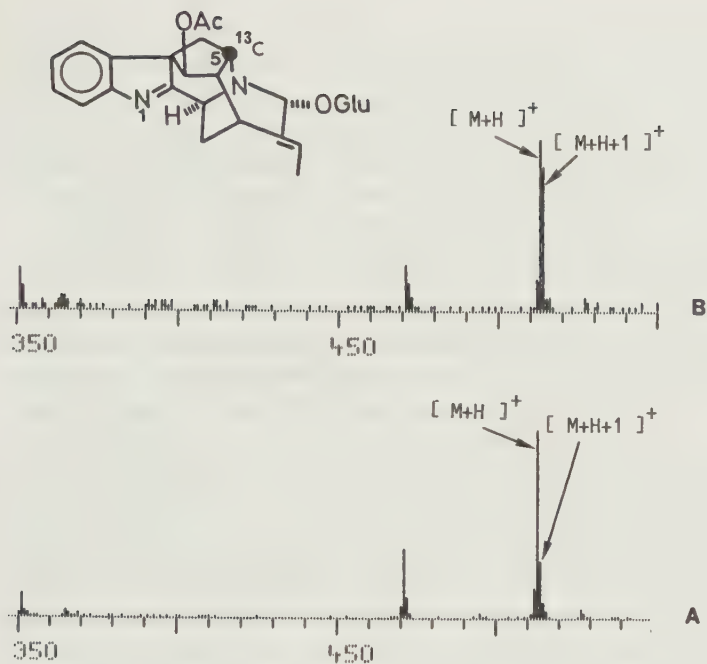


Abb.83 : Ermittlung des ^{13}C -Markierungsgrades von Raucaffricin aus den DCI-Spektren von A: Raucaffricin und B: [5- ^{13}C]Raucaffricin

Die HPLC-Analyse ergab, 2 Tage vor der durchgeführten NMR-Untersuchung, einen Raucaffricingehalt von 1.6 mg/ 3 g Frischgewicht. Nach Isolierung des Raucaffricins aus dem für die *in vivo* NMR-Messung eingesetzten Zellmaterial (Kolben C) konnte eindeutig die Resonanzlinie von [5- ^{13}C]Raucaffricin detektiert werden. Trotz der ermittelten Anreicherung (33%) reichte der relativ hohe Alkaloidgehalt nicht aus, um eine exakte *in vivo* Signalzuordnung vornehmen zu können, da lediglich eine Meßzeit von 2 Stunden zur Verfügung stand.

IV. DISKUSSION

Arzneipflanzen finden seit Jahrhunderten als Wirkstofflieferanten medizinische Verwendung. Durch Einsatz pflanzlicher Zellkulturen könnten darüberhinaus wesentliche Schwierigkeiten der herkömmlichen Arzneistoffgewinnung aus Pflanzen überwunden werden (vgl. ZENK 1982).

Die biotechnologische Produktion gewünschter Naturstoffe wäre unabhängig von jahreszeitlichen und witterungsbedingten Gegebenheiten. Eine Anzucht des Gewebes unter exakt definierten Laborbedingungen ermöglicht die Bereitstellung homogenen Zellmaterials von konstanter Qualität. Die Naturstoff- und Enzymisolierung aus pflanzlichem Gewebe ist problemlos durchführbar. Das Zellmaterial kann im Prinzip unbegrenzt vermehrt werden. Somit entfallen nach dem Abernten monate- bis jahrelange Wartezeiten.

Gerade die beiden letztgenannten Punkte sind bei einer herkömmlichen Naturstoffisolierung oftmals die limitierenden Faktoren. Dies trifft vor allem dann zu, wenn die Inhaltsstoffe wie im Fall der bearbeiteten Rauwolfia serpentina in den Wurzeln lokalisiert sind. Viele der bisher untersuchten Arzneidroge stammen aus tropischen Ländern; eine Veränderung labiler Naturstoffe während des Trocknungsprozesses kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Zellkulturen erlauben hingegen zu jedem beliebigen Zeitpunkt die exakte Bestimmung ihrer Inhaltsstoffe. Ferner gestatten sie durch Modifikationen der Nährlösungen eine direkte Einflußnahme auf den Stoffwechsel der kultivierten Pflanzenzelle.

Wie von AMRHEIN et al. (1980) gezeigt wurde, wird durch Zugabe eines spezifischen Hemmstoffs des Primärstoffwechsels, dem Herbizid Glyphosat, ein Enzym des Shikimisäure-Stoffwechsels blockiert. Somit werden auch Gramm-Mengen eines pflanzlichen Primärmetaboliten in den Zellkulturen akkumulierbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch- aus auch pflanzliche Sekundärstoff-Intermediate auf diese Wei- se zellulär angereichert werden können. Die in vitro regis- trierte Hemmung der Strictosidinglucosidasen durch Glucose konnte im in vivo Experiment durch Akkumulation von 0.5 g Strictosidin/l Medium bestätigt werden.

Aus Pflanzen ist Strictosidin aufgrund seines Intermediatcha- rakters, wie schon in der Einleitung erläutert, nur in Spuren isolierbar (SMITH 1968). Pflanzliche Zellkulturen erlauben da- mit neben der nach U.PFITZNER und ZENK (1982) durchgeführten zellfreien Synthese des Strictosidins auch die zelluläre Akkum- ulation dieses begehrten Indolglucosids.

Die Möglichkeit, eine Stoffwechselblockade in kultivierten Pflanzenzellen zu erzielen, eröffnet vielversprechende Perspek- tiven. Stickstoff-analoge Monosaccharide aus Mikroorganismen der Gattung Actinomycetales sind als hochpotente Inhibitoren für Säugetierglucosidasen bekannt (SCHMIDT et al. 1979). Inter- essanterweise wurden identische Verbindungen auch in höheren Pflanzen nachgewiesen (EVANS et al. 1985). Diese Substanzen entfalten bereits bei 10^{-6} molarer Konzentration ihre Hemmwir- kung. Bei den durchgeführten Experimenten zur Inhibierung der Strictosidinglucosidasen waren Glucosemengen jedoch bis in den molaren Bereich erforderlich. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob diese Inhibitoren auch zur Hemmung von Glu- cosidasen aus Rauwolfia Zellkulturen einsetzbar sind und so- mit die osmotische Belastung der Zellen durch hohe Zucker- gehalte verringern können.

Die systematische Variation der Nährmedienkomponenten eröff- net die Möglichkeit, mit pflanzlichen Suspensionskulturen auch industriell interessante Naturstoffmengen zu produzieren. Damit wurde zugleich der Beweis erbracht, daß Zellkulturen in der Lage sind, die differenzierte Pflanze hinsichtlich ihrer Produktionsleistung deutlich zu übertreffen. Tab. 12 gibt die höchsten Ausbeuten an Inhaltsstoffen wieder, die bisher mit Pflanzenzellkulturen erzielt wurden.

Nr.	Naturstoff	Herkunft	Ausbeute (g/l)	Literatur
1	Rosmarinsäure	<u>Coleus blumei</u>	5.0	PARNHAM und KESSELRING (1985)
2	Skikonin	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>	3.5	FUJITA (1985, persönliche Mitteilung)
3	Jatrorrhizin	<u>Berberis stolonifera</u>	2.7	HINZ und ZENK (1981)
4	Anthrachinone	<u>Morinda citrifolia</u>	2.5	ZENK <u>et al.</u> (1975)
5	Berberin	<u>Coptis japonica</u>	2.5	TABATA, YAMADA (1985, persönliche Mitteilung)
6	Shikimisäure	<u>Galium mollugo</u>	1.2	AMRHEIN <u>et al.</u> (1980)
	[Raucaffricin]	<u>Rauwolfia serpentina</u>	1.2	SCHÜBEL und STÖCKIGT (1985)

Tab.12 : Präparative Gewinnung pflanzlicher Inhaltsstoffe mit Zellkulturen

Nachdem Modellsysteme, so z.B. Zellsuspensionskulturen von Morinda citrifolia wesentliche Beiträge zum Verständnis der Stoffwechselregulation geliefert haben (ZENK et al. 1975), gewinnen anwendungsorientierte Gesichtspunkte zunehmend an Bedeutung. Neben der schon erwähnten kommerziellen Produktion des Naphtochinons Shikonin (siehe Einleitung) scheint auch der Prozeß zur technischen Herstellung des Isochinolinalkaloids Berberin aus Zellkulturen abgeschlossen (FUJITA, pers. Mitteilung).

Während in der differenzierten Rauwolfia serpentina Pflanze bis heute kein Raucaffricin detektiert werden konnte (KÄHLER 1970), wurden mit der entsprechenden Zellkultur 1.2 g dieses Glucoalkaloids/l Medium erzielt. Dieser Wert entspricht 2.5% des Trockengewichts und stellt zugleich den sechsthöchsten Gehalt eines Naturstoffes dar, der z.Zt. in Zellkulturen beobachtet wurde. Bisher waren als Raucaffricinquelle lediglich die Wurzeln der in Afrika beheimateten R.caffra bekannt. Bezogen auf das Trockengewicht des Ausgangsmaterials ist somit durch

die Zellkultur eine 10fach höhere Alkaloidausbeute erreichbar als bisher bei Rauwolfia-Pflanzen beobachtet wurde.

Differenzierte Pflanzen der Gattung Viola sind in der Lage über 30% an Sekundärmetaboliten zellulär zu akkumulieren (vgl. Übersichtsartikel von ZENK 1978). Überträgt man diesen Wert auf R.serpentina Zellen, so würde dies bei einer erzielten Ausbeute von 48 g Zelltrockenmasse/l Medium einen Raucaffricin-gehalt von ca. 14 g/l bedeuten. Dieses, zugegebenermaßen, rein theoretische Rechenexempel mag dennoch eines verdeutlichen: hinsichtlich der Speicherkapazität der Rauwolfia-Zellen muß für Raucaffricin die Grenze noch nicht erreicht sein.

In diesem Zusammenhang stellt sich zwangsläufig die Frage nach dem Akkumulationsort des Glucosids innerhalb der Zelle. Der Befund, daß sowohl Raucaffricin als auch die entsprechende Glucosidase aus dem gleichen Zellmaterial isoliert wurden, impliziert eine räumliche Trennung des Enzyms und Alkaloids. Dieses Phänomen der Kompartimentierung ist z.B. bei den Glucosinolatpflanzen (Cruciferae, Tropaeoaceae) weit verbreitet (MATILE 1984). Wesentliche Enzyme der Indolalkaloidbiosynthese, wie z.B. die Strictosidinsynthase oder die Strictosidinglucosidase sind im Cytosol lokalisiert (DEUS und ZENK 1984). Die Vakuolen hingegen scheinen nach MATILE (1984) völlig frei von Glycosyltransferasen zu sein. Durch Glycosylierung im Cytoplasma werden lipophile, für Pflanzenzellen oftmals toxische Inhaltsstoffe, in die wasserlösliche Form transformiert, womit die Voraussetzung für eine Anhäufung innerhalb der Vakuolen gegeben ist.

Eine entscheidende Beobachtung hinsichtlich des Aufnahmemechanismus von Alkaloiden in die Vakuolen gelang DEUS-NEUMANN und ZENK (1984). Experimente an isolierten Vakuolen ergaben, daß es sich hierbei um einen aktiven, ATP-abhängigen Mechanismus handelt, an dem spezifische Carrierproteine in der Tonoplastenmembran beteiligt sind.

Die Alkaloidaufnahme in die Vakuole wurde durch K^+ - und Mg^{2+} -Ionen stimuliert. Dieser Befund könnte eine Erklärung für die

erhöhten Raucaffricingehalte bei MgSO_4 -Überschuß im Nährmedium darstellen (siehe A.2.2.2.). Neben dem Einstrom des Raucaffricins in die Vakuole ist auch ein Wiederaustritt in das Cytoplasma denkbar. Möglicherweise kommt hierbei der enzymatischen Entglucosidierung bzw Glucosidsynthese eine wichtige regulatorische Bedeutung zu.

Energetisch ist die Hydrolyse eines aktivierten Zuckers (z.B. UDP-Glucose) gegenüber der Spaltung eines Sekundärstoffglycosids bevorzugt (HÖSEL 1981) ($A = \text{Aglycon}$).



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt somit auf der Seite der Glucosidbildung. In der Literatur ist lediglich ein Beispiel bekannt, bei dem mit der gleichen Enzympräparation auch eine meßbare Rückreaktion zum Zuckernukleotid registriert werden konnte (SUTTER und GRISEBACH 1975).

Dieser Befund legt zumindest die Vermutung nahe, daß an der Glucosidierung von Vomilenin und der Zuckerabspaltung des Raucaffricins zwei verschiedene Enzyme beteiligt sind. Eine Limitierung der Indolalkaloidbiosynthese durch die Tryptophan Decarboxylase Aktivität, wie von BERLIN (SASSE et al. 1983) für Catharanthus roseus postuliert, ist für die R. serpentina Zellkultur auszuschließen. Weitaus bedeutsamer scheint hier die Regulationsmöglichkeit auf der Stufe des Raucaffricins zu sein. Durch den beschriebenen Vakuolentransport des Glucoalkaloids wird eine inaktive Speicherform dem Biosynthesablauf entzogen. Die Kontrolle der zellulären Freisetzung des reaktiven Vomilenins müssen künftige Experimente klären.

Die neu entdeckte Raucaffricin β -D-glucosidase (SCHÜBEL et al. 1986) stellt neben der Strictosidinsynthese (U.PFITZNER und ZENK 1982) ein weiteres Beispiel eines Enzyms des Sekundärstoffwechsels dar, das für präparative Zwecke eingesetzt werden kann. In beiden Fällen wird durch Enzymkatalyse die Synthese eines Indolalkaloid-Intermediats durchführbar. Während die Autoren eine Enzymstabilisierung der Strictosidinsynthese durch Immobilisierung erreichten, wurde die Raucaffricin-glucosidase durch Gefriertrocknung in Gegenwart von Puffer-

salzen in eine lagerbeständige Form überführt (siehe B.2.4.9.). Analog einem chemischen Katalysator kann dieses Glucosidase-Lyophilisat bei Bedarf zur Synthese von Ajmalan-Sarpaganalkaloiden eingesetzt werden. Die Untersuchung der Substratspezifität dieses Enzyms ergab zwar, daß von den getesteten natürlich vorkommenden Glycosiden ausschließlich Raucaffricin umgesetzt wird, darüber hinaus konnten aber chemisch derivatisierte Glucoside des Ajmalan- und Sarpagan-Typs ebenfalls enzymatisch hydrolysiert werden. Präparativ ließ sich die Glucosidase-Reaktion in einem Zweiphasensystem aus H_2O und Ethylacetat durchführen. Somit kann diese Umsetzung kontinuierlich erfolgen und die gebildeten Aglyca in einfacher Weise extrahiert und in reiner Form erhalten werden. Während die 21-O-Glucosidierung des Vomilenins zum Raucaffricin in vivo einem Entgiftungsvorgang der Zelle gleichkommen könnte, stellt die glucosidische Verknüpfung eine Schutzgruppe dar, die gezielte Veränderungen des Alkaloidgrundgerüsts ermöglicht. Wegen der Reaktivität des Aglycons wären diese nicht auf dieser Stufe möglich. Abb. 84 läßt die enge strukturelle Verwandtschaft des Raucaffricins zu Ajmalin erkennen. Obwohl sich Ajmalin schon seit über 25 Jahren (KLEINSORGE 1959) bei der Behandlung von Herzrhythmusstörungen bewährt hat, konnte bis heute keine der drei veröffentlichten Totalsynthesen dieses Alkaloids wirtschaftliche Bedeutung erlangen (MASAMUNE et al. 1967, MASHIMO et al. 1969, VAN TAMELEN et al. 1970). Die industrielle Ajmalingewinnung erfolgt nach wie vor durch Extraktion des Wirkstoffes aus Rauwolfia Wurzeln (ANET et al. 1954).

Das Zellkulturprodukt Raucaffricin, dessen präparative Isolierung durch RLCC-Chromatographie problemlos durchführbar ist (SCHÜBEL und STÖCKIGT 1984) könnte andererseits durch nur vier Reaktionen (siehe Abb. 84) eine Partialsynthese des Ajmalins ermöglichen. Entscheidend hierbei wäre die Reihenfolge des Reaktionsablaufs. Bei Abspaltung des 17-O-Acetylrestes von Indoleninverbindungen der Ajmalanreihe entstehen labile Hydroxyindolenine, die sich in stabilere Sarpaganderivate umlagern. Zur Aufrechterhaltung des Ajmalinringsystems müßte

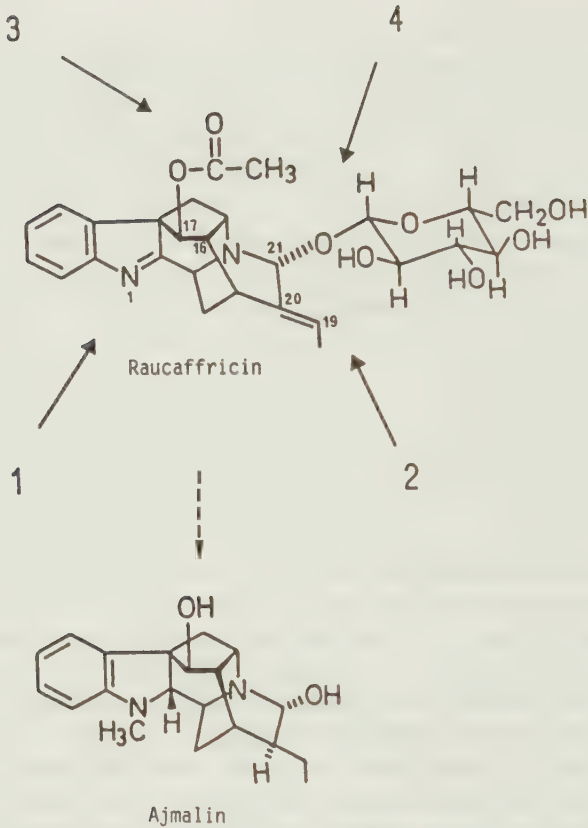


Abb.84 : Strukturelle Verwandtschaft von Raucaffricin und Ajmalin

deshalb zunächst die 1,2-Doppelbindung reduziert werden. Nach den von DANIELI *et al.* (1984) angegebenen Bedingungen würde in Gegenwart von Formaldehyd eine gleichzeitige Einführung der N-Methylgruppe gelingen. Nach katalytischer Reduktion der 19, 20-Ethylidenseitenkette kann durch chemische bzw. enzymatische Hydrolyse die Acetyl- und Glucoseeinheit entfernt werden. Diese vier Reaktionen konnten mit zufriedenstellenden Ausbeuten durchgeführt werden (1 : 85%, 2 : 54%, 3 : 80%, 4 : 90%). Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Reaktions-

produkte ergab, daß bei der Reduktion der Indolenindoppelbindung das Hydridion von der weniger gehinderten Seite in die 2 α -Stellung des Moleküls eingeführt wurde. Dies erklärt sich aus der enormen sterischen Behinderung durch die Verbrückung der Kohlenstoffatome C-16 und C-17 (siehe Abb. 84). Bei enzymkatalysierter Reduktion (vgl. PFITZNER 1984) hingegen erfolgt selektiv der Einbau in die 2 β -Position. Auf chemischem Wege werden somit neue Ajmalinderivate mit der unnatürlichen C2-Konfiguration zugänglich, die auf ihre pharmakologische Aktivität hin überprüft werden könnten.

Die Kondensation von primären Aminen mit Aldehyden unter Ausbildung einer Schiffschen Base ist eine Schlüsselreaktion der Alkaloidbiosynthese. Diese Reaktion hat in der Vergangenheit auch immer wieder elegante Naturstoffsynthesen ermöglicht. Ein klassisches Beispiel ist die Darstellung des Tropinons aus Succindialdehyd, Methylamin und Acetondicarbonsäure nach SCHÖPF et al. (1935). Die entscheidende Reaktion neuerer biomimetischer Synthesen von Aspidosperma-Alkaloiden ist ebenfalls die Verknüpfung einer Aldehydkomponente mit einer Aminfunktion (KUEHNE et al. 1983).

Das Glucoalkaloid Raucaffricin ermöglichte durch einfache Syntheseschritte den präparativen Zugang zu reaktiven Aldehydderivaten. Die in Abb.85 aufgeführten Strukturen lassen erkennen, daß durch Kopplung mit beliebigen primären Aminen in Zukunft die Partialsynthese einer Vielzahl neuer Alkaloidabkömmlinge ausgeführt werden kann.

Auf dem gleichen Reaktionsprinzip beruht die biomimetische Synthese N-analoger Heteroyohimbinderivate (s.III.C.1.). In einer "Eintopfreaktion" wird hierbei eine enzymatische mit einer chemischen Reaktion verknüpft. Aus Strictosidin wurde durch die entsprechende Glucosidase ein reaktives Intermediat in Freiheit gesetzt. Das entstandene 4,21-Dehydrogeissoschizin kondensiert mit einem zugesetzten primären Amin zur Schiffschen Base, die anschließend, der Biosynthese des hypotensiven Ajmalicins entsprechend, cyclisiert. Die Variabilität der beschriebenen Synthese erlaubt in einer einfach durch-

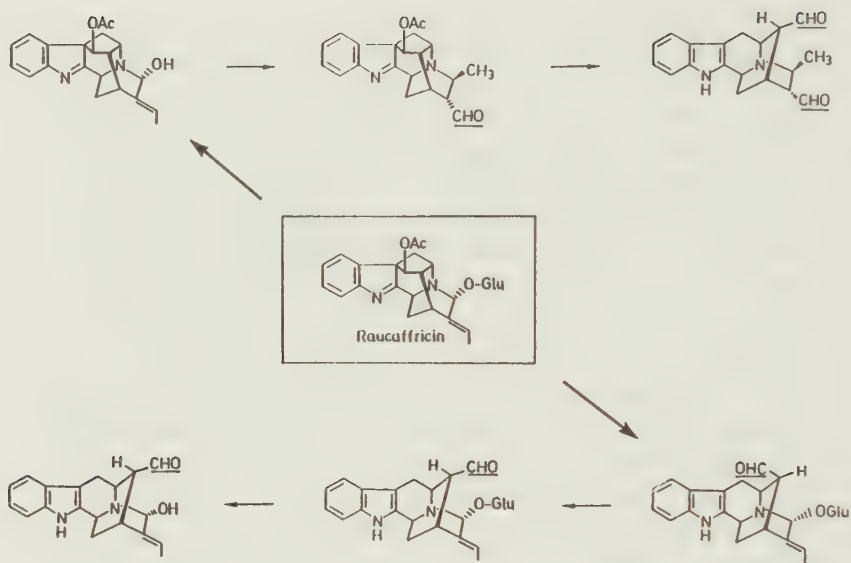
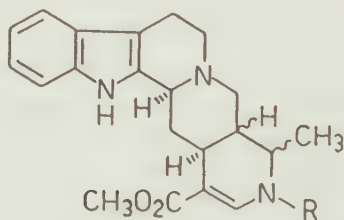
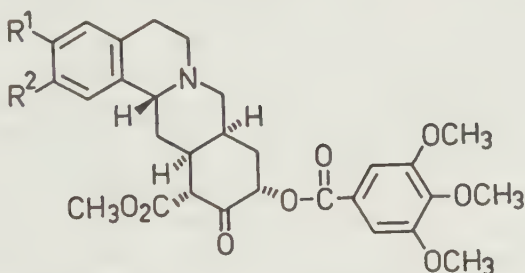


Abb.85 : Biomimetische Bedeutung des Raucaffricins

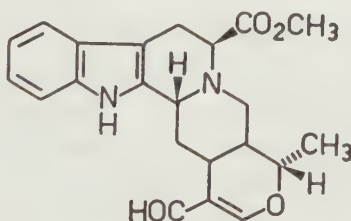
zuführenden Reaktion beliebige Substituenten in das Heteroyohimbingerüst einzuführen. Das biochemische Potential, das in reaktiven Alkaloidintermediaten wie 4,21-Dehydrogeissoschizin verborgen liegt, kann somit gezielt für präparative Strukturmodifikationen eingesetzt werden. Mit dem beschriebenen divergenten Syntheseprinzip lassen sich aus Strictosidin neue Alkaloidderivate der folgenden Struktur darstellen:



Die Arbeitsgruppe von SZANTAY befaßt sich, allerdings rein chemisch orientiert, mit der Synthese ähnlicher Strukturen (SZANTAY et al. 1983):



WINTERFELDT beschrieb 1984 die Partialsynthese einer strukturell ebenfalls verwandten neuen Heteroyohimbinverbindung (FLECKER und WINTERFELDT 1984):



Die Suche nach neuen Wirkstoffen schließt in zunehmendem Maße auch biologische Testmethoden mit ein. Rezeptorbindungsstudien werden heute routinemäßig in der pharmazeutischen Industrie beim pharmakologischen Vorscreening neuer Substanzen eingesetzt. Die schnelle Durchführbarkeit der Radiorezeptorassays hat sie zu einem wertvollen Instrument moderner Arzneimittelforschung werden lassen. 1982 konnte mit dieser Strategie aus Picralima nitida Zellkulturen ein neues Indolalkaloid mit starker Affinität zum Opiatrezeptor entdeckt werden (ARENS et al. 1982). Darüberhinaus ermöglichen Rezeptorbindungsstudien auch die exakten Angriffsorte von Pharmaka im Körper aufzufinden. So konnten inzwischen mehrere Bindungsstellen für Benzodiazepine im Gehirn von Versuchstieren lokalisiert werden (FEHSKE et al. 1982).

Bei allen durchgeführten Radiorezeptortests muß jedoch betont werden, daß es sich hierbei stets nur um Affinitätsmessungen handelt. Resorptions-, Biotransformations- und Eliminationsvorgänge werden nicht berücksichtigt, die mitentscheidend sind für eine medizinische Anwendung. Deshalb sind Substanzen mit hoher Rezeptorbindung in jedem Fall im anschließenden Tierversuch weiter zu untersuchen. Das Beispiel des Nacyclins (vgl. C.2.) bestätigt die Richtigkeit dieses Vorgehens.

Die bislang hergestellten N-analogen Heteroyohimbine wiesen signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Rezeptoraffinität auf. Bei Substanz S 6 (siehe Abb. 86) war eine deutliche Bindung am α -Rezeptor feststellbar. Eine Erklärung hierfür könnte in der strukturellen Verwandtschaft zum Catecholamingerüst liegen:

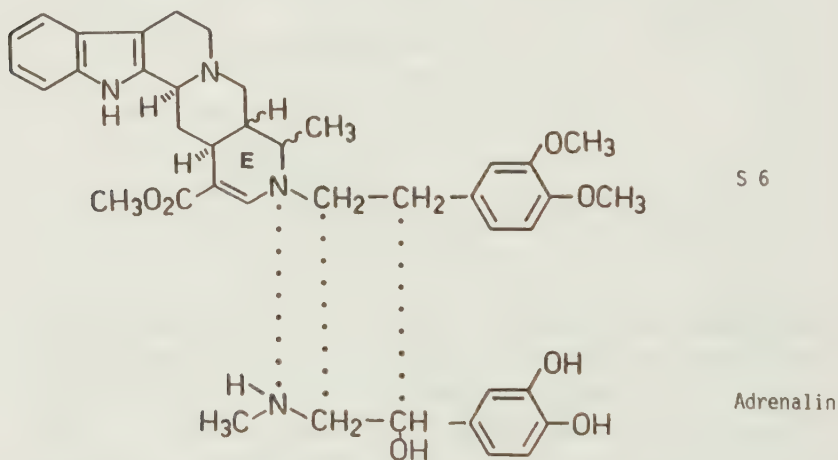


Abb.86 : Strukturelle Verwandtschaft eines synthetisierten N-analogen Heteroyohimbinalkaloids mit Adrenalin

Die gestrichelten Linien verdeutlichen ähnliche Molekülabstände. Nach Trennung des Isomerengemisches von S 6 resultierten unterschiedliche IC_{50} -Werte (halmaximale Hemmkonzentrationen) für die Einzelkomponenten (siehe C.3.1.). Neben der Art des Stickstoffsubstituenten in Ring E hat demzufolge auch

die räumliche Anordnung des Heteroyohimbinsystems (siehe Abb. 87) einen entscheidenden Einfluß auf das Rezeptorbindungsverhalten der jeweiligen Verbindung.

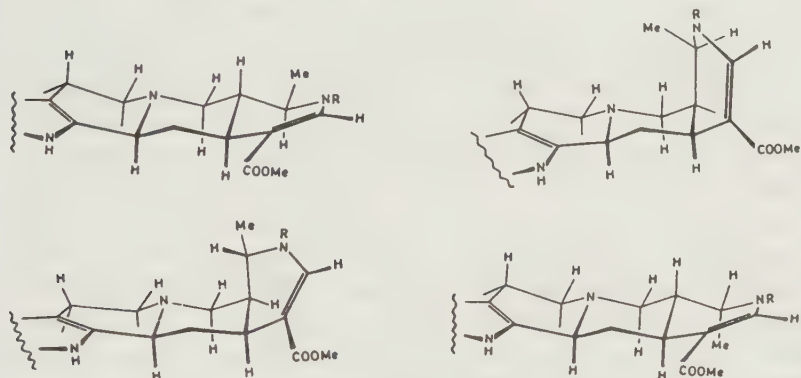


Abb.87 : Unterschiedliche räumliche Anordnung N-analoger Heteroyohimbine

Es gilt nun, in künftigen Experimenten die biologisch aktiven Verbindungen auszuwählen, die Reaktionsbedingungen im speziellen Fall zu optimieren sowie weitere Strukturmodifikationen vorzunehmen. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung aller vier isomeren Formen sollte weitere wichtige Erkenntnisse über die sterische Anordnung der komplementären Rezeptorregion ermöglichen.

Beeindruckend sind in diesem Zusammenhang jüngste Ergebnisse auf dem Gebiet der Computergraphik (siehe HANSCH 1981, SCHULZ 1984). Sie erlauben die sterische Darstellung von Rezeptorregionen. Diese Methodik rückt somit in die Nähe eines möglichen drug design: bei Kenntnis der Rezeptorstruktur könnten entsprechende Wirkstoffe maßgeschneidert konstruiert werden.

Moderne Methoden der Informationsverarbeitung werden auch auf dem Gebiet der Synthesepaltung eingesetzt. Die Arbeitsgruppe um JORGENSEN entwickelte hierzu das CAMEO-Programm (= Computer Assisted Mechanistic Evaluation of Organic Reactions) (PEISHOFF und JORGENSEN 1983). Mit dessen Hilfe wird versucht, bei Eingabe der Struktur von Startmolekülen sowie der Reaktionsbedingungen Aussagen über die zu erwartenden

Strukturen der Syntheseprodukte zu treffen. Aus diesem Grunde wurde die Simulation einer sauer katalysierten Umlagerung des Strictosidinaglycons durchgeführt. Sie ergab nach Computer-Voraussage (Abb. 88) acht verschiedene Verbindungen.

Experimentell gefunden wurde jedoch das Alkaloid Nacyclin (vgl. III.2.) als Syntheseprodukt. Lediglich Strukturvorschlag 2 und 4 lassen aufgrund des vorhandenen 7-Ringes einen ähnlichen Reaktionsablauf vermuten. Obwohl dieses Computerprogramm für einfache aliphatische Strukturen erfolgreich eingesetzt wurde, offenbaren die Ergebnisse die Problematik einer computergestützten Reaktions-Voraussage für polyfunktionelle Naturstoffe. Zumindest zum jetzigen Zeitpunkt wird damit zugleich die Richtigkeit der Strategie bestätigt, biosynthetische Reaktionsabläufe auch als Vorbild für chemische Alkaloidumsetzungen mit zu verwenden.

Wie am Beispiel des 4,21-Dehydrogeissoschizins demonstriert, eignen sich reaktive Stoffwechselintermediate aus pflanzlichen Zellkulturen als Startmolekül für biomimetische Synthesen. Da jedoch instabile Zwischenverbindungen meist nicht isolierbar sind, wäre durch Einsatz moderner NMR-Meßtechniken ein wesentlicher Fortschritt möglich. Falls es gelingt, einen Einbau hochmarkierter Vorstufen in Alkaloide zu erreichen, sollten Fütterungsversuche an Pflanzenzellen auch NMR-spektroskopisch verfolgt werden können. Damit bestünde die Möglichkeit, neue, bislang unentdeckte Biosyntheseintermediate aufzufinden. Daß bei derartigen Messungen aufgrund der Signalintensität auch Veränderungen innerhalb des Primärstoffwechsels in die Untersuchung einbezogen werden müssen, verdeutlichen die durchgeführten in vivo Messungen mit R.serpentina Zellen. Zugleich könnte sich hieraus eine neue Methode der "in process" Kontrolle für pflanzliche Zellkulturen ergeben aufgrund einer direkten Beobachtung der Stoffwechselvorgänge in der lebenden Zelle.

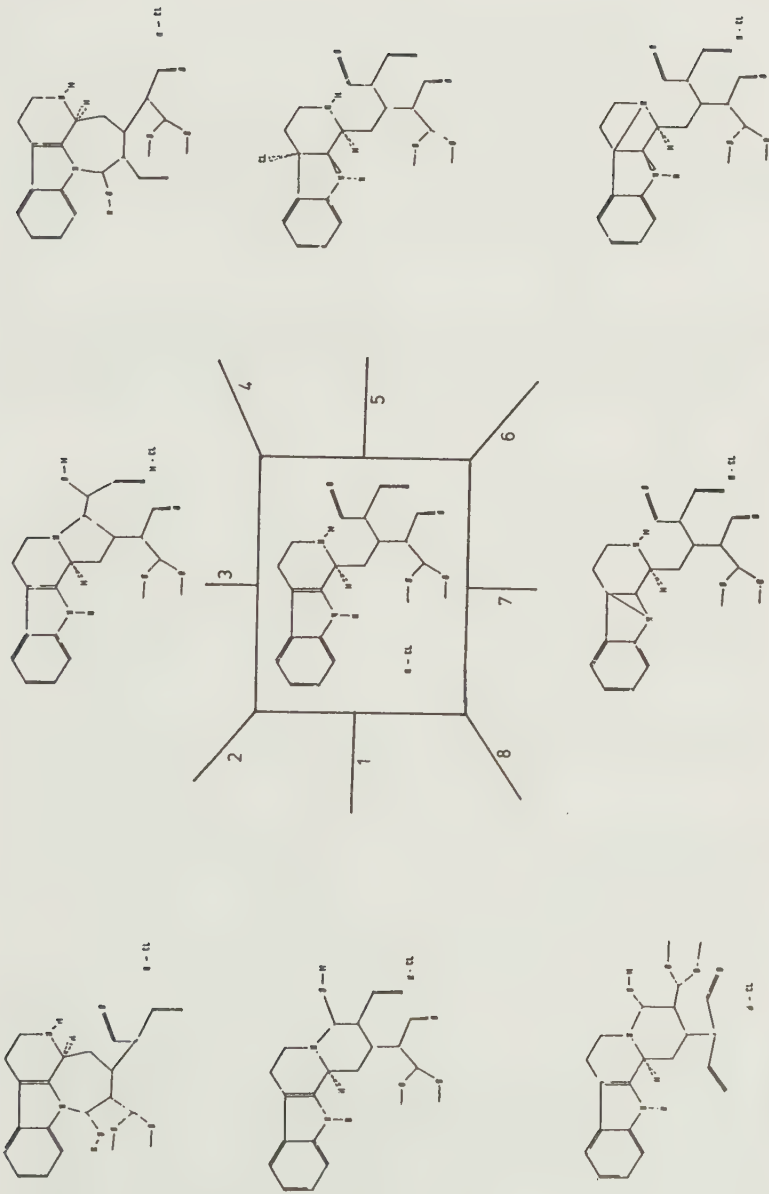


Abb.88 : Strukturvorschläge einer H^+ -katalysierten Strictosidinumwandlung (ermittelt nach dem CAMEO-Programm)

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Anwendung pflanzlicher Zellkulturen zur Synthese neuer Alkaloidderivate. Hierbei ergaben sich unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten, die sich im wesentlichen in vier Strategien zusammenfassen lassen.

1. Die Möglichkeit, über pflanzliche Zellkulturen ein Endprodukt des Sekundärstoffwechsels direkt durch zelluläre Synthese präparativ zu gewinnen, wobei durch Modifizierung des Nährmediums die Produktion des gewünschten Naturstoffs optimiert wird.

Das Glucoalkaloid Raucaffricin konnte zum ersten Mal in pflanzlichen Zellkulturen nachgewiesen werden. NMR-spektroskopische und enzymatische Untersuchungen erforderten eine Strukturrevision des seit 1965 in der Literatur als Vomilenin α -D-galactosid beschriebenen Alkaloids. Die Strukturanalyse ergab, daß Raucaffricin identisch ist mit einem Vomilenin β -D-glucosid. Durch Variation der Zusammensetzung der Nährmedien von Rauwolfia serpentina Zellkulturen wurde eine Raucaffricinproduktion von 1.2 g/l Nährlösung erzielt. Dieser Wert bedeutet, auf das Trockengewicht des Zellmaterials bezogen, eine 10fache Steigerung gegenüber der bisher einzig bekannten Raucaffricinquelle, den Wurzeln von Rauwolfia caffra Sond.. Der Einsatz flüssig-flüssig verteilungschromatographischer Methoden gestattet den präparativen Zugang zum Raucaffricin. Bisher wurden 50 g dieses Alkaloids aus Zellkulturen isoliert. Das stabile Indoleninglucosid Raucaffricin ließ sich durch einfache Umsetzung in 16 neue Alkaloidabkömmlinge überführen.

2. Gezielte Inhibierung eines Enzyms des Sekundärstoffwechsels ermöglicht die Akkumulation von Biosyntheseintermediaten. Diese polyfunktionellen Verbindungen werden damit auch in größerer Menge isolierbar und für Strukturvariationen zugänglich. Die Aktivität der Strictosidinglucosidasen wird in Gegenwart

hoher Glucosekonzentrationen gehemmt. Dieses Resultat wurde auch am in vivo System bestätigt. Die Alkaloidzwischenstufe Strictosidin ließ sich erstmals zellulär akkumulieren. Der bisher höchste Wert betrug 0.5 g Strictosidin/l und wurde unter Einsatz eines modifizierten Mediums mit 170 g Glucose/l Nährlösung erzielt. Die Trennung der Glucoalkaloide Strictosidin und Raucaffricin gelingt im Gramm-Maßstab durch Rotation Locular Countercurrent Chromatography (RLCC).

3. Einsatz pflanzlicher Zellkulturen als Enzymquelle.

3.1. Nach Isolierung und Anreinigung pflanzlicher Sekundärstoff-Enzyme kann in vitro die enzymatische Alkaloidsynthese im präparativen Maßstab erfolgen. Nach Abtrennung biogenetischer Folgeenzyme sind Zwischenstufen der Alkaloidbiosynthese herstellbar.

Nachdem ein vereinfachtes dreistufiges Trennverfahren zur Secologanin-Isolierung aus Blättern von Lonicera xylosteum entwickelt worden war, wurde die enzymatische Kondensation mit Tryptamin zu Strictosidin ausgeführt. Durch Immobilisierung der Strictosidinsynthase nach U.PFITZNER und ZENK (1982) ist nun auch der präparative Zugang dieses Indolglucosids gesichert.

3.2. Zellfreie Synthesen erlauben die quantitative Darstellung von Alkaloiden, die unter in vivo Bedingungen nicht oder nur als Nebenprodukt gebildet werden.

Das neu entdeckte Enzym Raucaffricin β -D-glucosidase (E C 3.2.1.-) stellt das zweite Beispiel eines pflanzlichen Sekundärstoffenzym dar, das gezielt für präparative Synthesen eingesetzt werden kann. Folgende Eigenschaften des aus R.serpentina Zellkulturen isolierten Enzyms wurden ermittelt:

Sein pH-Optimum liegt bei 5.1, das Temperaturoptimum bei 38°C. Für den isoelektrischen Punkt resultierte ein Wert von 5.8 ± 0.2 . Das Molekulargewicht der Glucosidase wurde durch Gelfiltration zu 66 600 Dalton $\pm$ 5% bestimmt. Der K_m -Wert des Enzyms beträgt für Raucaffricin 1.4 mM ($V_{max} = 560$ pkat). Raucaffricin wurde als einzig natürlich

vorkommendes Glycosid umgesetzt. Die Aktivität der Raucafficinglucosidase wird durch 6-Gluconolacton nicht beeinflusst. In Gegenwart von 0.8 M Glucose wird vollständige, bei 0.95 M Fructose 30%ige Hemmung der Enzymaktivität erreicht. Aufgrund seiner Stabilität konnte das Enzym bei 78%igem Erhalt der katalytischen Aktivität durch Kombination von Gel- und Ionenaustauschchromatographie über 1300fach angereichert werden. Gefriertrocknung eines Proteinrohextraktes von R.serpentina in Anwesenheit von 100 mM Kaliumphosphatpuffer ermöglichte die Glucosidase in eine lagerfähige Form überzuführen. Die präparative Verwendung des Enzyms erfolgte in einem Ethylacetat-Wasser Zweiphasensystem unter kontinuierlicher Extraktion des lipophilen Aglycons. Damit sind sowohl Vomilenin als auch derivatisierte neue Alkaloidstrukturen darstellbar. Bisher wurden acht neue Vomileninabkömmlinge synthetisiert.

3.3. Biotransformation von Alkaloiden, die aus einer anderen Quelle als das Enzym stammen.

Perakin, ein Umlagerungsprodukt des Vomilenins, wurde durch NADPH-abhängige Reduktion mit einem R.serpentina Proteinrohextrakt enzymatisch in das Indolalkaloid Raucaffrinolin überführt. Durch die Selektivität der Enzymreaktion bleibt die Indolenindoppelbindung im Alkaloid erhalten.

4. Durch Kombination enzymatischer und chemischer Methoden sind neue Alkaloide synthetisierbar. Biomimetische Reaktionen lassen den Einbau niedermolekularer Verbindungen in das Alkaloidgrundgerüst zu.

Mit einem Proteinextrakt aus Zellkulturen von Catharanthus roseus (L.) G.Don sind bei Anwesenheit von Strictosidin sowie eines primären Amins N-analoge Heteroyohimbinalkaloide darstellbar. Die allgemeine Anwendbarkeit dieses Reaktionsprinzips erlaubt den Einsatz primärer Amine beliebiger Struktur. Diese werden in einer biomimetischen Synthese, die direkt die Ajmalicinbiosynthese imitiert, in das Alkaloidgerüst eingebaut. Bislang wurden 36 Reaktionsprodukte nach dem beschrie-

benen Verfahren hergestellt. Ein pharmakologisches Vorscreening dieser Verbindungen erfolgte über Rezeptorbindungsstudien. Die synthetischen Substanzen wurden hinsichtlich ihrer Bindung an den α - und β -Rezeptor sowie an die Benzodiazepin- und Imipraminbindungsstellen untersucht. Im Gegensatz zu den eingesetzten Ausgangsverbindungen (primäre Amine) zeigten drei der synthetischen Heteroyohimbinderivate (S 6, S 7, S 8, siehe C.3.1.) signifikante Rezeptoraffinität. Die IC_{50} -Werte der Substanz S 6 ergaben für die getrennten Isomere Resultate zwischen $2.4 \times 10^{-7}M$ und $4.4 \times 10^{-6}M$. Diese Werte liegen in der Größenordnung der Bezugssubstanz für den α -Rezeptor (Dihydroergocryptin $IC_{50} = 3.5 \times 10^{-6}M$). Für Nacyclin, dessen Synthese aus Strictosidin erstmals in Ausbeuten um 40% gelang, wurde ebenfalls Bindung an den α -Rezeptor registriert (98% bei $10^{-4}M$, 55% bei $10^{-6}M$). Die im in vivo Tierexperiment gefundene Blutdrucksenkung durch Nacyclin bestätigt die Relevanz von Rezeptorbindungsstudien als pharmakologisches Screeninginstrument.

Abb. 89 faßt diese Anwendungsmöglichkeiten für pflanzliche Zellkulturen graphisch zusammen. Die eingesetzten Alkaloide sowie deren Vorstufen sind wie folgt abgekürzt:

A : Secologanin	F : Perakin
B : Tryptamin	G : Raucaffrinolin
C : Strictosidin	X : NH_2 -R
D : Vomilenin	D' : chemisches Vomileninderivat
E : Raucaffricin	E' : chemisches Raucaffricinderivat

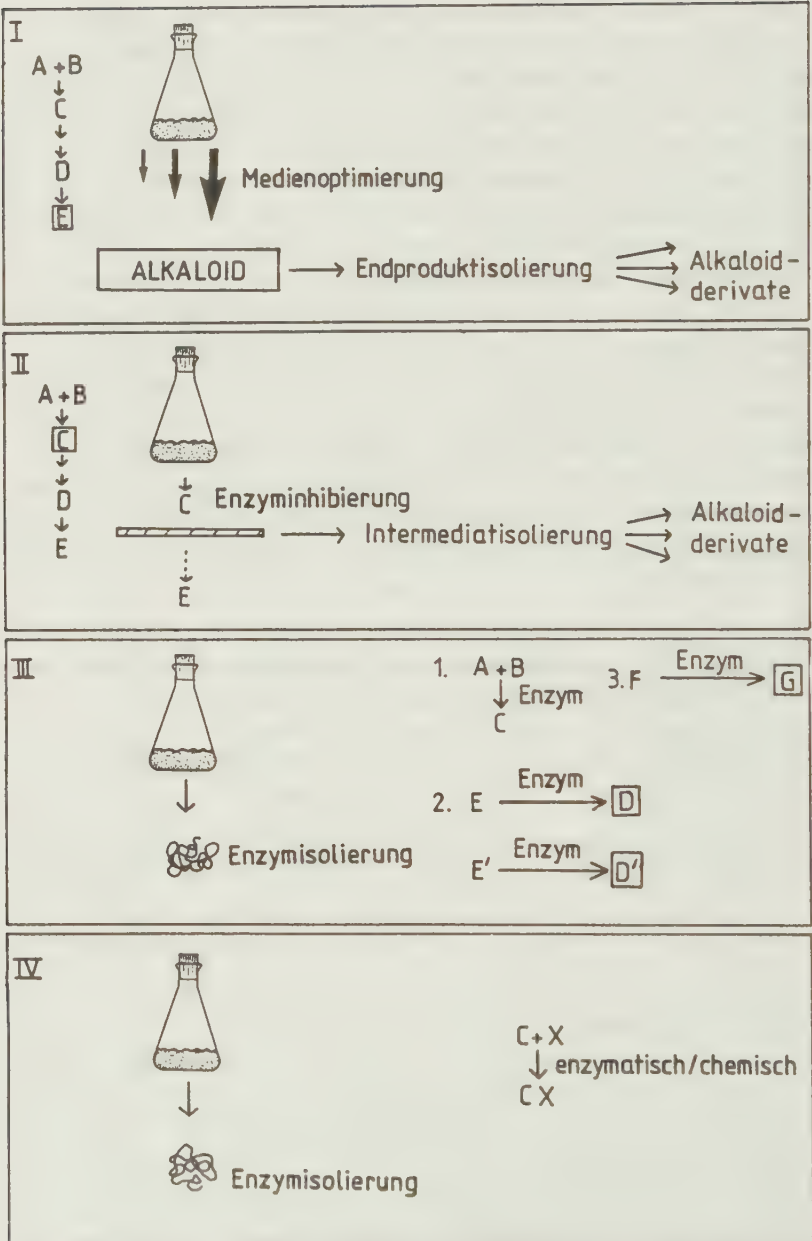


Abb.89 : Einsatz pflanzlicher Zellkulturen zur Bereitstellung neuer Alkaloidderivate

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AHLERS J.: Enzymkinetik, S.55, G.Fischer Verlag Stuttgart (1982).
- ALFERMANN A.W.: Production of natural compounds by plant cell culture methods, 33. Vortragstagung, Ges. für Arzneipflanzenforschung, Regensburg (1985).
- AMRHEIN N., DEUS B., GERK P., STEINRUECKEN H.,: The Site of the inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate II. Influence of Glyphosate with Chorismate Formation In Vivo and In Vitro. Plant Physiol. 66, 830-834 (1980).
- ANET F.A.L., CHAKRAVARTI D., ROBINSON R., SCHLITTLER E.,: Ajmaline Part I, J.Chem.Soc. 1242-1260 (1954).
- ARENS H., BORBE H.O., ULBRICH B., STÖCKIGT J.,: Detection of Pericine, a New CNS-active Indole Alkaloid from Picralima nitida Cell Suspension Culture by Opiate Receptor Binding Studies, Planta Medica 46, 210-214 (1980).
- BAERHEIM SVENDSEN A.: Biogene Arzneistoffe - heute noch oder heute wieder? In: Biogene Arzneistoffe, Czygan F.C. (Hrsg.) Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden (1984).
- BARUAH P., BARUAH N.C., SHARMA R.P., BARUAH J.N., KULANTHAIVEL P., HERZ W.,: A Monoacyl Galactosylglycerol from Sonchus arvensis, Phytochemistry 22, 1741-1744 (1983).
- BATTERSBY A.R., BURNETT A.R., PARSONS P.G.: Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside: Biosynthesis of the Three Major Classes of Indole Alkaloids from the β -Carboline System. Chem.Comm., 1282-1284 (1968).
- BATTERSBY A.R., BURNETT A.R., PARSONS P.G.: Alkaloid Biosynthesis. Part XIV. Secologanin: Its Conversion into Ipecoside and its Role as Biological Precursor of the Indole Alkaloids. J.Chem.Soc. (C), 1187-1192 (1969).
- BATTERSBY A.R., BROWN S.H., PAYNE T.G.: Biosynthesis of Loganine and the Indole Alkaloids from Hydroxygeraniol - Hydroxynerol. Chem.Comm., 827-828 (1970).
- BENN R., GÜNTHER H.: Moderne Pulsfolgen in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie. Angew.Chem. 95, 381-411 (1983).
- BERETZ A., ROTH-GEORGER A., CORRE G., KUBALLA B., ANTON R., CAZENAVE J.P.: Polyindolic Alkaloids from Psychotria forsteriana. Potent Inhibitors of the Aggregation of Human Platelets, Planta Medica 4, 300-303 (1985).

- BRADFORD M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- BRESLOW R.: Biomimetic Chemistry, *Chem.Soc.Rev.* 1, 553-580 (1972).
- BRESLOW R.: Biomimetic Control of Chemical Selectivity, *Acc. Chem.Res.* 13, 170-177 (1980).
- BRISTOL J.A., EVANS D.B.: Cardiogenic agents for the treatment of heart failure. *Annu.Rep.Med.Chem.* 16, 93-102 (1981).
- BROWN R.T., CHAPPLE C.L., LASHFORD A.G.: Alternative Cyclisation of 3 α - and 3 β -Indole Alkaloid Glucosides. *Chem. Comm.*, 295-296 (1975).
- BROWN R.T.: Biomimetic Conversion of Secologanin into Alkaloids. *Stud.Org.Chem. (Amsterdam)* 13, 21-35 (1983).
- CHAUDHURI R.K., STICHER O.: Xylostosidine: The First of a New Class of Monoterpene Alkaloid Glycosides from Lonicera xylosteum L. *Helv.Chim.Acta* 63, 1045-1047 (1980).
- CLARK J.M., SWITZER R.L.: *Experimental Biochemistry*. W.H. Freeman, San Francisco (1977).
- CONCHIE J., LEVY G.A.: Inhibition of glycosidases by aldolactones of corresponding configuration. *Biochem. J.* 65, 389-395 (1957).
- CORDELL G.A.: The Biosynthesis of Indole Alkaloids, *Lloydia* 37, 219-298 (1974).
- COREY E.J., SHIMOJI K., SHIH C.: Synthesis of Prostaglandines, *J.Amer.Chem.Soc.* 106, 6425-6427 (1984).
- CZYGAN F.C.: Biogene Arzneistoffe im Spiegel moderner Forschung. Vortrag auf dem Bayer. Apothekertag Augsburg (1985).
- DANIELI B., PALMISANO G., SEVERINI RICCA G.: ¹³C-NMR of some Ajmalane Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 22, 4007-4008 (1981).
- DANIELI B., LESMA G., PALMISANO G., RIVA R.: Rapid Access to the Highly Oxygenated Aspidosperma Alkaloids Vindoline, Vindorosine and Cathovaline. *J.Chem.Soc., Chem.Comm.* 909-911 (1984).
- DEUS-NEUMANN B., ZENK M.H.: A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* 162, 250-260 (1984).

- DICKINSON R.G., JACOBSEN N.W.: A New Sensitive and Specific Test for the Detection of Aldehydes: Formation of 6-Mercapto-3-substituted-S-triazolo-(4,3-b)-S-Tetrazines. *Chem.Comm.* 1719-1720 (1970).
- EL-NAGGAR L.J., BEAL J.L.: Iridoids. A Review, *J.Nat.Prod.* 43, 649-776 (1980).
- ESCHER S., LOEW P., Arigoni D.: The Role of Hydroxygeraniol and Hydroxynerol in the Biosynthesis of Loganin and Indole Alkaloids. *Chem.Comm.* 823-825 (1970).
- EVANS S.V., FELLOWS L.E., SHING T.K.M., FLEET G.W.J.: Glycosidase Inhibition by Plant Alkaloids which are Structural Analogues of Monosaccharides. *Phytochemistry* 24, 1953-1955 (1985).
- FEHSKE K.J., ZUBE I., BORBE H.O., WOLLERT U., MÜLLER W.E.: β -Carboline Binding Indicates the Presence of Benzodiazepine Receptor Subclasses in the Bovine Central Nervous System. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol* 319, 172-177 (1982).
- FLECKER P., WINTERFELDT E.: Indole Alkaloid Analogues from *Didrovaltratum*. *Tetrahedron* 40, 4853-4863 (1984).
- FUJITA Y., AARA Y., SUGA C., MORIMOTO T.: Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of *Lithospermum erythrorhizon* II. A New Medium for the Production of Shikonin Derivatives. *Plant Cell Rep.* 1, 61-63 (1981).
- GAMBORG O.L., MÜLLER P.A., OJIMA K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soyabean Root Cells. *Exp.Cell. Res.* 50, 151-158 (1968).
- GÜNTHER H.: *NMR-Spektroskopie*, Thieme Verlag Stuttgart, New York (1983).
- HABIB M.S., COURT W.E.: Estimation of the Alkaloids of *Rauwolfia caffra*. *Planta Medica* 25, 261-266 (1974).
- HAHLBROCK K., GRISEBACH H.: Biosynthesis of flavonoids. In: MABRY T.J., MABRY H. (eds.) *The flavonoids*. Chapman and Hall, London (1975).
- HALL L.D., MORRIS G.A.: Measurement of Carbon-13-Proton Coupling-Constants in Oligosaccharides by Two-Dimensional Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Carbohydr.Res.* 82, 175-184 (1980).
- HANSCHE C.: The Physicochemical Approach to Drug Design and Discovery (QSAR) *Drug Dev.Res.* 1, 267-309 (1981).

- HEINSTEIN P., HÖFLE G., STÖCKIGT J.: Involvement of Cathenamine in the Formation of N-Analogues of Indole Alkaloids. *Planta Medica* 37, 349-357 (1979).
- HEMSCHIEDT T., ZENK M.H.: Glucosidases Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of *Catharanthus* Cell Cultures. *FEBS Lett.* 110, 187-191 (1980).
- HEMSCHIEDT T.: Bildung und Umsetzung von Iminiumcathenamin, katalysiert durch spezifische Enzyme aus *Catharanthus roseus*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1983.
- HESSE M.: INDOLALKALOIDE, In: Fortschritte der Massenspektroskopie, H.Budzikiewicz (Herausg.) Vol.1, Verlag Chemie, Weinheim (1979).
- HESSE M., MEIER H., ZEEH B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme Verlag Stuttgart, New York 1984.
- HINZ H., ZENK M.H.: Production of Protoberberine Alkaloids by Cell Suspension Cultures of *Berberis* Species. *Naturwissenschaften* 67, 620-621 (1981).
- HOSTETTMANN K., HOSTETTMANN-KALDAS M., STICHER O.: Preparative Scale Separation of Xanthenes and Iridoid Glycosides by Droplet Counter-Current Chromatography. *Helv. Chim.Acta* 62, 2079-2085 (1979).
- HÖFLE G., HEINSTEIN P., STÖCKIGT J., ZENK M.H.: ^1H -NMR Analysis of Ajmalicine-Type Alkaloids of the 3 α Series. *Planta Medica* 40, 120-126 (1980).
- HÖSEL W.: Glycosylation and Glycosidases, In: The Biochemistry of Plants, CONN E.E., (Ed.), Academic press, New York (1981).
- HUSSON H.-P., KAN-FAN C., SEVENET T., VIDAL J.-P.: Structure de la Cathenamine Intermediaire Clé de la Biosynthèse des Alcaloides Indoliques. *Tetrahedron Lett.* 22, 1889-1892 (1977).
- HUTCHINSON C.R., HECKENDORF A.H., STRAUGHN J.L., DADDONA P.E., CANE D.E.: Biosynthesis of Camptothecin. 3. Definition of Strictosamide as the Penultimate Biosynthetic Precursor Assisted by ^{13}C and ^2H NMR Spectroscopy. *J.Am. Chem.Soc.* 101, 3358-3369 (1979).
- JOHNSON W.S., GRAVESTOCK M.B., Mc CARRY B.E.: Acetylenic Bond Participation in Biosynthetic-Like Olefinic cyclizations. *J.Am.Chem.Soc.* 93, 4330-4332 (1971).
- JOHNSON W.S.: Biomimetische Cyclisierung von Polyenen. *Angew. Chem.* 2, 33-66 (1976).

- KÄHLER H.J.: Rauwolfia Alkaloide. Boehringer Mannheim GmbH (1970).
- KHAN N.H., KHAN M.A., SIDDIQUI S.: The alkaloids of Rauwolfia caffra. I. Isolation of ajmalicine, ajmaline, raucafrine and three new alkaloids, raucaffricine, raucaffriline and raucaffridine. Pakistan J.Sci.Ind.Res. 8, 23-27 (1965).
- KHAN M.A., AHSAN A.M.: The Structure of Raucaffricine. Tetrahedron Lett. 59, 5137-5138 (1970).
- KHAN M.A., SIDDIQUI S.: Isolation and structure of raucaffrinoline. A new alkaloid from Rauwolfia caffra. Experimentia 28 (2), 127-128 (1972).
- KHAN M.A., HORN H., VOELTER W.: Isolierungen und ¹³C-NMR-Spektroskopie von Indoleninalkaloiden. Z.Naturforsch. 37 b, 494-498 (1982).
- KINAST G., TIETZE L.-F.: Biogeneseähnliche Synthese von Secologanin und Swerosid-aglyconmethylläther. Chem.Ber. 109, 3626-3639 (1976).
- KLEINSORGE H.: Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Rauwolfia-Alkaloids Ajmalin bei Herzrhythmus-Störungen, insbesondere bei Extrasystolie. Med. Klin. 54, 409-412 (1959).
- KLÜSENER K.H.: Verbreitung, Isolierung und Eigenschaften von Logenin-Derivaten in höheren Pflanzen. Staatsexamensarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1976.
- KOMPIS I., HESSE M., SCHMID H.: An Approach to the Biogenetic Classification of Indole Alkaloids. Lloydia 34, 269-291 (1971).
- KOROLKOVAS A.: Grundlagen der molekularen Pharmakologie. Thieme Verlag Stuttgart (1974).
- KRONEBERG G., OVERBECK W.: Combined effect of the Rauwolfia alkaloids reserpine and raubasine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exptl.Pathol.Pharmacol. 328, 169-171 (1956).
- KUEHNE M.E., EARLEY W.G.: Studies in Biomimetic Alkaloid Syntheses -9. Two total Syntheses of Minovincine. Tetrahedron 39, 3707-3714 (1983).
- LEETE E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids I. The Incorporation of Tryptophan into Ajmaline. J.Am.Chem. Soc. 82, 6338-6342 (1960).

- LIBOT F., KUNESCH N., POISSON J.: Structure complete de la Raucaffrinoline et Filation avec la Vomilenine. *Phytochemistry* 19, 989-991 (1980).
- LINSMAIER E.M., SKOOG F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol.Plant.* 18, 110-125 (1965).
- LOUNASMAA M., JOKELA R.: A 400 ¹H-NMR Study of Twelve Ajmaline-Type Alkaloids, *Heterocycles* 23, 1503-1508 (1985).
- LUCKNER M.: Moderne Aspekte der Produktion und Entwicklung pflanzlicher Arzneimittel. *Pharmazie* 40, 433 (1985).
- MAGNUS P.D., EXON C.E., SEAR N.L.: Indole-2,3-Quinodimethanes. *Tetrahedron* 39, 3725-3729 (1983).
- MARCINOWSKI S., GRISEBACH H.: Enzymology of Lignification. *Eur.J.Biochem.* 87, 34-44 (1978).
- MASAMUNE S., ANG S.K., EGLI C., NAKATSUKA N., SARKAR S.K., YASUNARI Y.: The Synthesis of Ajmaline. *J.Am.Chem.Soc.* 89, 2506-2507 (1967).
- MASHIMO K., SATO Y.: On the Synthesis of Ajmaline. *Tetrahedron Lett.* 11, 905-906 (1969).
- MATILE P.: Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71, 18-24 (1984).
- NAGAKURA N., RÜFFER M., ZENK M.H.: The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine. *J. Chem.Soc.Perkin Trans. I*, 2308-2312 (1979).
- NEUSS N.: The Spectrum of Biological Activities of Indole Alkaloids, in: *Indole and Biogenetically Related Alkaloids* edited by J.D.Phillipson, M.H.Zenk, Academic Press London (1980).
- NOULS J.C., WOLLAST P., BRAEKMAN J.C., VAN BINST G., PECHER J., MARTIN R.H.: Application of Internal Nuclear Overhauser Effects (NOE) in Organic Chemistry: Dehydrovoachalotine. *Tetrahedron Lett.* 23, 2731-2734 (1968).
- NUHN P.: Aktuelle Probleme der Arzneistoffforschung. *Pharmazie* 40, 1-9 (1985).
- PARNHAM M.J., KESSELRING K.: Rosmarinic Acid. *Drugs of the Future* 10, 756-757 (1985).
- PEISHOFF C.E., JORGENSEN W.L.: Computer-Assisted Mechanistic Evaluation of Organic Reactions. 4. Organosilicon Chemistry. *J.Org.Chem.* 48, 1970-1979 (1983).

- PETERSON D.H., MURRAY H.C., EPPSTEIN S.M., REINEKE L.M., WEINTRAUB A., MEISTER P.D., LEIGH H.M.: Microbiological Transformations of Steroids. *J.Am.Chem.Soc.* 74, 5933-5936 (1952).
- PFEFFER P.E., VALENTINE M.K., PARRISH F.W.: Deuterium-Induced Differential Isotope Shift ¹³C-NMR. *J.Am.Chem.Soc.* 101, 1265-1274 (1979).
- PFITZNER A., STÖCKIGT J.: Partial Purification and Characterization of Geissoschizine-Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 21, 1585-1588 (1982).
- PFITZNER A., STÖCKIGT J.: Biogenetic Link Between Sarpagine and Ajmaline Type Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 24, 5197-5200 (1983a).
- PFITZNER A., STÖCKIGT J.: Polyneuridine Aldehyde Esterase: an Unusually Specific Enzyme Involved in the Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids. *J.Chem.Soc.Chem. Commun.* 459-460 (1983b).
- PFITZNER A.: Die Biosynthese der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1984.
- PFITZNER U., ZENK M.H.: Immobilization of Strictosidine-Synthase from *Catharanthus* Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine. *Planta Medica* 46, 10-14 (1982).
- RIGHETTI P.G., GELFI C.: Immobilized pH gradients for isoelectric focussing. III. Preparative separations in highly diluted gels. *J.Biochem.Biophys.Methods* 9, 103-119 (1984).
- ROBERTS J.K.M.: Study of Plant Metabolism in vivo using NMR Spectroscopy. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 35, 375-386 (1984).
- RÜFFER M., NAGAKURA N., ZENK M.H.: Strictosidine, the Common Precursor for Monoterpenoid Indole Alkaloids with 3 α and 3 β Configuration. *Tetrahedron Lett.* 18, 1593-1596 (1978).
- SAKAI S.I., YAMAMOTO Y., HASEGAWA S.: The Chemical Transformation of Gardnerine to 2-Acylindole Alkaloid "Ochropine". *Chem.Pharm.Bull.* 28, 3454-3456 (1980).
- SASSE F., BUCHHOLZ M., BERLIN J.: Site of Action of Growth Inhibitory Tryptophan Analogues in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Z.Naturforsch.* 38c, 910-915 (1983).

- SCHAEFER J., STEISKAL E.O., BEARD C.F.: Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of metabolism in soya-beans labeled by $^{13}\text{CO}_2$. Plant Physiol. 55, 1048-1053 (1975).
- SCHÖPF C., LEHMANN G.: Die Synthese des Tropinons, Pseudopelletierins, Lobelanins und verwandter Alkaloide unter physiologischen Bedingungen. Liebigs Ann.Chem. 518, 1-37 (1935).
- SCHÖPF C., THESING J.: Die Umsetzung quartärer Salze von Mannich-Basen mit tertiären Aminen (zur Reindarstellung quartärer Salze des Gramins). Angew.Chem. 16 377-378 (1951).
- SCHMIDT D.D., FROMMER W., MÜLLER L., TRUSCHEIT.: Glucosidase-Inhibitoren aus Bazillen. Naturwiss. 66, 584-585 (1979).
- SCHULZ G.E.: Definierte molekulare Wechselwirkungen als Basis-biologischer Systeme. Biologie in unserer Zeit 14, 121-124 121-124 (1984).
- SCHÜBEL H., STÖCKIGT J.: RLCC-Isolation of Raucaffricine from its Most Efficient Source-Cell Suspension Cultures of Rauwolfia serpentina Benth. Plant Cell Rep. 3, 72-74 (1984).
- SCHÜBEL H., TREIBER A., STÖCKIGT J.: Structure Revision of the Rauwolfia Alkaloid Raucaffricine. Helv.Chim.Acta 67, 2078-2081 (1984).
- SCHÜBEL H., STÖCKIGT J., FEICHT R., SIMON H.: Partial Purification and Characterisation of Raucaffricine B-D-glucosidase from Plant Cell Suspension Cultures of Rauwolfia serpentina Benth. Helv.Chim.Acta, zur Veröffentlichung eingereicht (1986).
- SEN G., BOSE K.G.: Rauwolfia serpentina - a New Indian Drug for Insanity and High Blood Pressure. Indian Med. World 2, 194 (1931).
- SMITH G.N.: Strictosidine: a Key Intermediate in the Biogenesis of Indole Alkaloids. Chem.Comm. 912-914 (1968).
- SNYDER J.K., NAKANISHI K., HOSTETTMANN K., HOSTETTMANN M.: Applications of Rotation Locular Countercurrent Chromatography in Natural Products isolation. J.Liqu.Chromatogr. 7, 243-256 (1984).
- SOUZU I., MITSUHASHI H.: Structures of Iridoids from Lonicera morrowii A. Gray II. Tetrahedron Lett. 2, 191-192 (1970).
- STÖCKIGT J., ZENK M.H.: Isovincoside (Strictosidine), the Key Intermediate in the Enzymatic Formation of Indole Alkaloids. FEBS Lett. 79, 233-237 (1977a).

- STÖCKIGT J., ZENK M.H.: Strictosidine (Isovincoside): the Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Chem. Commun.* 646-648 (1977b).
- STÖCKIGT J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine. *Phytochem.* 18, 965-971 (1979).
- STÖCKIGT J.: The Biosynthesis of Heteroyohimbine-Type Alkaloids in : Indole and Biogenetically Related Alkaloids. J.D. Phillipson, M.H. Zenk (Herausg.). Academic Press, New York (1980).
- STÖCKIGT J., PFITZNER A., FIRL J.: Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Plant Cell Rep.* 1, 36-39 (1981).
- STÖCKIGT J., PAWEŁKA K.-H., TANAHASHI T., DANIELI B., HULL W.: Voafrine A and Voafrine B, New Dimeric Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Voacanga africana* Stapf. *Helv. Chim. Acta* 66, 2525-2533 (1983).
- STÖCKIGT J.: Biosynthesis of Tryptophan Derived Alkaloids in Higher Plants: Enzymatic Formation of the Sarpagine-Ajmaline Group . In: Progress in Tryptophan and Serotonin Research H.G. Schlossberger, W. Kochen, B. Linzen, H. Steinhart (eds.) Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York (1984).
- SUNG Y.-I., KOIKE K., NIKAIDO T., OHMOTO T., SANKAWA U.: Inhibitions of Cyclic AMP Phosphodiesterase in *Picrasma quassioides* BENNETT, and Inhibitory Activities of Related β -Carboline Alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1872-1877 (1984).
- SUTTER A., GRISEBACH H.: Free Reversibility of the UDP-Glucose: Flavonol 3-O-Glucosyltransferase Reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 444-447 (1975).
- SZANTAY C.: 15-Trimethoxy-benzoyloxyl-berbane Derivatives with Long Lasting Hypotensive Activity and No CNS Effects. EP 0 091 185 A2 (1983).
- TANAHASHI T., NAGAKURA N., INOUE H., ZENK M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Loganin and the Bio-transformation of Loganin to Secologanin by Plant Cell Cultures. *Phytochemistry* 23, 1917-1922 (1984).
- TANIMURA T., PISANO J.J., ITO Y., BOWMAN R.: Droplet Counter-current Chromatography. *Science* 169, 54-56 (1970).
- TAYLOR W.I., FREY A.J., HOFMANN A.: Vomilenin und seine Umwandlung in Perakin. *Helv. Chim. Acta* 72, 611-614 (1962).
- TIETZE L.-F.: Untersuchungen zur Synthese von Iridoiden. *Chem. Ber.* 107, 2491-2498 (1974).

- TIETZE L.-F.: Secologanin, eine biogenetische Schlüssel-
verbindung - Synthese und Biogenese der Iridoid- und
Secoiridoidglycoside. *Angew.Chem.* 95, 840-853 (1983).
- ULBRICH B., ZENK M.H.: Partial Purification of Hydroxycinna-
moyl-CoA: Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase from
Higher Plants. *Phytochemistry* 18, 929-933 (1979).
- ULSHAFFER P.R., BARTLETT M.F., DORFMAN L., GILLEN M.A.,
SCHLITTLER E., WENKERT E.: Isolation and Structure of
Perakine. *Tetrahedron Lett.* 11, 363-367 (1961).
- VAN BEEK T.A., VERPOORTE R., BAERHEIM SVENDSEN A.: Antimi-
crobially Active Alkaloids from *Tabernaemontana chippii*.
J.Nat.Prod. 48, 400-423 (1985).
- VAN TAMELEN E.E., OLIVER L.K.: The Biogenetic-Type Total Syn-
thesis of Ajmaline. *J.Am.Chem.Soc.* 92, 2136-2137 (1970).
- VOLLOSOVICH A.G., PUCHININA T.N., NIKOLAEVA L.A.: Optimiza-
tion of Macrosalt Composition for *Rauwolfia serpentina*
Benth. Tissue Culture. *Rastit.Resur* 15 (4), 516-526
(1979).
- WALSH C.: *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman & Co. San
Francisco 1981.
- WEILER E.W.: Radioimmuno-Screening Methods for Secondary
Plant Products in: *Plant Tissue Culture and its bio-
technological Application*, W.Barz, E.Reinhard, M.H.
Zenk (Herausg.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York 266-284 (1977).
- WENKERT E., WICKBERG B., LEICHT C.L.: The Stereochemistry
of Tetrahydroalstonine and Related Indole Alkaloids.
Acta Chem.Scand.B 36, 607-611 (1982).
- WHEELER D.M.S.: R.B.Woodward und die moderne organische
Chemie. *Chemie in unserer Zeit* 4, 109-119 (1984).
- WINK M., HARTMANN T.: Physiological and biochemical aspects
of quinolizidine alkaloid formation in cell suspension
cultures. In: Fujiwara A.(ed) *Plant tissue culture*
1982. Maruzen, Tokyo (1982).
- WOODWARD R.B., CAVA M.P., OLLIS W.D., HUNGER A., DAENIKER
H.U., SCHENKER K.: The Total Synthesis of Strychnine.
J.Am.Chem.Soc. 76, 4749-4751 (1954).
- WOODWARD R.B., BADER F.E., BICKEL H., FREY A.J., KIERSTEAD
R.W.: The Total Synthesis of Reserpine. *J.Am.Chem.
Soc.* 78, 2023-2025 (1956).

- WRAY V., SCHIEL O., BERLIN J.: High field phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of the phosphate metabolites in cell suspension cultures of Nicotiana tabacum. Z.Pflanzenphysiol. 112, 215-220 (1983).
- ZENK M.H., EL-SHAGI H., SCHULTE U.: Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia. Planta Med.Suppl. 79-101 (1975).
- ZENK M.H., EL-SHAGI H., ARENS H., STÖCKIGT J., WEILER E.W., DEUS B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In : Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application, Proceedings in Life Science. W. Barz, E.Reinhard, M.H.Zenk (eds.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977.
- ZENK M.H.: The Impact of Plant Tissue Culture on Industry. In: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. T.A. Thorpe (ed.), Calgary (1978).
- ZENK M.H.: Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung in: Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin, Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte, 112. Versammlung, Mannheim 1982.
H.A.Staab, W.Gerek, H.Markl, W.Martienssen, H.Gibian (Herausg.) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 145-162 (1982).
- ZENK M.H.: Enzymology of Benzylisoquinoline Alkaloid Formation. In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. J.D.Phillipson, M.F.Roberts, M.H.Zenk (eds.) Springer Verlag Berlin (1985).

D A N K S A G U N G

Herrn Doz. Dr. J.Stöckigt, der mir freundlicherweise die Bearbeitung dieses Themas überließ, danke ich an dieser Stelle sehr herzlich. Seine Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. M.H.Zenk sei vielmals für die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten gedankt.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. D.Bieniek (München) für die Zurverfügungstellung einer RLCC-Anlage, Herrn Dr. A.Treiber (München) für die Messung von NMR-Spektren sowie Frau Dr. U.Pfützner (z.Z.Boston) für die Einarbeitung in die Enzym-immobilisierung.

Der Firma Nattermann (Köln) danke ich für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen sowie dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn) für die finanzielle Unterstützung. Empfänger der Finanzmittel war Herr Doz. Dr. J.Stöckigt.

LEBENS LAUF

Schübel, <u>Helmut</u> , Hermann	geboren am 4.10.1955 in Fürth/Bayern als Sohn des Kaufmanns Werner Schübel und seiner Ehefrau Friederike, geb. Schulz
Schulbildung	Sept. 1961 - Juli 1966 Volksschule in Lauf/Pegnitz; Sept. 1966 - Juni 1975 Gymnasium Lauf
Abitur	21.6.1975 in Lauf
Wehrdienst	Juli 1975 - Sept. 1976 in Amberg/Oberpfalz
Studium	WS 1976/77 Lebensmittelchemie an der Technischen Universität in Berlin SS 1977 - WS 1980/81 Pharmazie an der Friedrich Alexander Universität Erlangen/ Nürnberg
Pharm.Staatsexamen	1.Abschnitt Sept. 1979 2.Abschnitt Mai 1981 3.Abschnitt Juni 1982
Approbation	2.9.1982
Promotion	seit Jan. 1982 unter Anleitung von Doz. Dr. J.Stöckigt am Institut für Pharmazeu- tische Biologie der Universität München

